

**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

**PROCEDURA SPECIFICĂ
IDENTIFICAREA MICROORGANISMELOR**

COD: POL – M1 - 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborilă

ELABORAT
Dr. Olga Filip

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 14

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânanu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 3 din 14

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 14

CUPRINS

1. SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
 - 5.1. CONDIȚII PREALABILE
 - 5.2. RESURSE NECESARE
 - 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
 - 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
 - 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 14

1. SCOPUL

Procedura descrie principalele teste biochimice și de mobilitate folosite în identificarea tulpinilor izolate din produse biologice.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII , Cod: MCL – 01
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definiții

Identificarea biochimică se bazează pe studiul activității enzimactice a microorganismelor din cadrul metabolismului energetic și catabolismul glucidic, proteic sau lipidic.

4.2. Abrevieri

TSI = Triple Sugar Iron Agar
MIU = Mobilitate Indol Ureaza
FA = Fenil – alanin - dezaminaza
OX = Oxidaza
OF = Test oxidare – fermentare
L = Lactoza

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 14

AC = acid
AL = alcalin

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiții prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecție și va respecta normele de protecția muncii și de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură, coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice, conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider
- lampa UV
- microscop optic

Resurse

- anse;
- lame microscop;
- ulei de parafina
- bec de gaz Bunsen;
- baie colorare;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
- pense;
- pipete automate;
- pipete sterile;
- varfuri albastre și galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
- lame/lamele;
- eprubete sterile de 10/10;
- stative eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

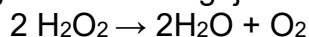
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 7 din 14

5.3. Continutul procedurii

5.3.1. Teste enzimatică folosite în identificarea cocilor gram-pozitivi aerobi-facultativ anaerobi

Testul catalazei

Principiu: prezența catalazei determină descompunerea peroxidului de hidrogen în apă și oxigen care se degajă sub formă de bule.



Testul permite diferențierea cocilor gram-pozitivi care posedă catalază din genurile *Staphylococcus* și *Micrococcus* de cei catalazo-negativi din genurile *Streptococcus* și *Enterococcus*.

Tehnica de lucru: se depune pe o lamă de microscop o picătură de H_2O_2 în care se dispersează 1-2 colonii din cultura de testat, prelevate cu un bețișor din lemn. Se evită practicarea testului cu ansa metalică sau pe culturi dezvoltate pe geloză sânge întrucât pot conduce la rezultate fals pozitive.

Citire și interpretare

- test pozitiv: degajare de bule de gaz până la efervescentă
- test negativ: lipsă de bule după dispersia coloniilor

Control de calitate

- martor pozitiv: *Staphylococcus aureus*
- martor negativ: *E. faecalis*

Testul coagulazei

Principiu: dintre tulpinile de interes medical, numai tulpinile de *S. aureus* coagulează plasma de iepure sau om prin doi factori care cel mai frecvent coexistă:

- **coagulaza liberă**, enzimă extracelulară care activează un factor plasmatic similar trombinei și este pusă în evidență prin testul la tub;
- **coagulaza legată** de peretele celular (*clumping factor*) care acționează direct asupra fibrinogenului și este detectată prin testul pe lamă.

a. Efectuarea testului pe lamă

Tehnica de lucru: se efectuează o suspensie suficient de densă într-o picătură de apă distilată din tulpina de testat; dacă nu apare o autoaglutinare, se adaugă o picătură de plasmă de om, obținută după centrifugarea sângelui recoltat pe EDTA, proaspătă sau conservată la frigider.

Citire și interpretare

- test pozitiv: formare de aglutinate în interval de 15-20 sec;
- absența aglutinării; testul negativ necesită a fi confirmat prin testul la tub.

b. Efectuarea testului la tub

Tehnica de lucru: se repartizează 0,5 ml plasmă de om diluată 1/5 în eprubetă 10/100, în care se realizează o suspensie din cultura de identificat, urmată de incubare la 35°C timp de 4-18 ore.

Citire și interpretare

- test pozitiv: coagul prezent (în masă sau vâl de fibrină) după incubare la 35°C timp de 4 ore sau după reincubare până la 18 ore → *S. aureus*;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 14

- test negativ: absența cheagului → stafilococ coagulazo-negativ.

Control de calitate

- martor pozitiv: *S. aureus*
- martor negativ: *S. epidermidis*

c. Utilizarea truselor comercializate

Identificarea rapidă a speciei se face cu ajutorul reactivilor comerciali de aglutinare. Reactivii sensibilizați cu fibrinogen și IgG cuplează coagulaza legată, respectiv proteina A din peretele *S. aureus*, ducând la aglutinarea amestecului dintre reactiv și cultura de *S. aureus*.

Testarea sensibilității la Novobiocină

Principiu: *S. saprophyticus*, spre deosebire de alți stafilococi coagulazo-negativi de interes medical, este rezistent la Novobiocină.

Efectuarea testului: suspensia cu densitatea 0,5 McFarland din tulpina de testat este însămânțată pe mediul Mueller-Hinton folosind tehnica pentru efectuarea antibiogramei, apoi se depune un microcomprimat de Novobiocină (5 μg); incubare la 35°C în aerobioză timp de 16-18 ore.

Citire și interpretare

- tulpină sensibilă: diametrul zonei de inhibiție > 16 mm (sau conform instrucțiunilor producătorului);
- tulpină rezistentă: diametrul ≤ 16 mm → *S. Saprophyticus* (sau conform instrucțiunilor producătorului).

Control de calitate

- martor pozitiv: *S. saprophyticus*
- martor negativ: *S. epidermidis*

Testarea sensibilității la Bacitracină

Principiu: *S. pyogenes* (streptococ grup A) este sensibil la concentrații joase de bacitracină (0,04 U) în timp ce alți streptococi β-hemolitici sunt rezistenți. Aproximativ 1% din tulpinile de *S. pyogenes* pot fi rezistente și 5-10% din ceilalți streptococi β-hemolitici pot fi sensibili.

Efectuarea testului: se preleva cu ansa 3-4 colonii beta hemolitice și se însămânțează tulpina de testat pe un sector de agar sânge în striuri dese, în 3 direcții suprapuse pentru a se obține o creștere confluentă; se depune apoi în centrul inoculului un microcomprimat cu bacitracină 0,04 U sau 0,1 U. Incubare la 35°C timp de 18 ore.

Citire și interpretare

- test pozitiv: orice zonă de inhibiție a creșterii în jurul discului cu bacitracină de 0,04 U sau un diametru >11 mm în jurul discului cu 0,1 U bacitracină indică *S. pyogenes*;
- test negativ: cultivare până la marginea discului cu bacitracină un diametru <11 mm în jurul discului cu 0,1 U bacitracină indică alți streptococi β-hemolitici.

Control de calitate:

- martor pozitiv: *S. pyogenes*;
- martor negativ: *S. agalactiae*.

Testarea sensibilității la optochin

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 14

Principiu: majoritatea tulpinilor de *S. pneumoniae* sunt sensibile la optochin (etilenhidrocupreină), spre deosebire de streptococii viridans care sunt rezistenți.

Efectuarea testului: se însămânțează tulpina de testat pe un sector de agar sânge în striuri dese, în 3 direcții suprapuse pentru a se obține o creștere confluentă; se depune apoi în centrul inoculului un microcomprimat cu optochin (5 µg). Incubare la 35°C în atmosferă cu 5% CO₂ timp de 18-24 ore.

Citire și interpretare

- tulpină sensibilă (test pozitiv) : diametrul zonei de inhibiție ≥14 mm)→ *S. pneumoniae* ;
- tulpină rezistentă (test negativ): diametrul < 14 mm).

Control de calitate

- martor pozitiv: *S. pneumoniae*
- martor negativ: streptococ viridans

Testul cu bilă-esculină

Principiu: Enterococii și streptococii de grup D cresc pe mediul cu 40% bilă și hidrolizează esculina cu eliberare de glucoză și esculetină; esculetina reacționează cu citratul de fier din mediu și formează un compus de culoare neagră.

Efectuare: se însămânțează tulpina de identificat pe mediul bilă-esculină turnat în pantă în eprubete 10/100. Incubează la 35°C timp de 18-24 ore și încă 24 ore dacă testul este negativ.

Citire și interpretare

- test pozitiv: cultivarea tulpinii și înnegrirea mediului → *Enterococcus* sp. și streptococi din grupul D;
- test negativ: lipsa de înnegrire a mediului; numai cultivarea nu constituie un rezultat pozitiv.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Enterococcus faecalis*
- martor negativ: streptococ viridans

5.3.2. Teste biochimice și de mobilitate folosite în identificarea bacililor gram-negativi aerobi și facultativ anaerobi

Mediul T.S.I.

Principiu: mediu multitest folosit în identificarea bacililor gram-negativi din familia *Enterobacteriaceae*, care conține glucoză (0,1%), lactoză și zaharoză (1%), sulfat feros, tiosulfat de sodiu și roșu fenol ca indicator de pH. Mediul este repartizat în eprubete de 12/120 mm în coloană (2,5-3cm) și în pantă; permite evidențierea următoarelor caractere:

- fermentarea glucozei cu sau fără producere de CO₂ prin virarea în galben a coloanei cu sau fără prezența de bule sau fragmentarea coloanei;
- fermentarea lactozei și/sau zaharozei cu virarea în galben a pantei;
- producerea de H₂S din descompunerea tiosulfatului de sodiu pus în evidență cu sulfatul feros ca indicator, prin înnegrirea mediului.

Însămânțare și incubare: o colonie este repicată cu ansă cu buclă mică și însămânțată prin înteparea mediului dispus în coloana și apoi pe suprafața pantei în striuri paralele. Incubare la 35°C timp de 18-24 ore.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 10 din 14

Citire și interpretare: se înregistrează fermentarea sau nu a lactozei și/sau zaharozei în pantă (AC sau AL), urmată de confirmarea sau infirmarea fermentării glucozei în coloană (AC sau AL) și la sfârșit producerea sau nu de H₂S. Apar 5 situații distincte:

AL/AC H₂S+; AL/AC H₂S-; AC/AC H₂S+; AC/AC H₂S-; AL/AL.

Primele 4 profile orientează efectuarea unor teste adiționale biochimice pentru identificarea la nivel de gen sau specie (schema de identificare din anexa 3). Ultimul profil exclude prezența unui bacil gram-negativ din familia *Enterobacteriaceae*.

Control de calitate

AL/AC H₂S+: *Proteus mirabilis*

AL/AC H₂S-: *Shigella sonnei*

AC/AC H₂S-: *Escherichia coli*

AC/AC cu H₂S+: *Citrobacter freundii*

Al/AL: *Pseudomonas aeruginosa*

Mediul cu manită și uree

Indicații: Triaajul biochimic al *Enterobacteriaceae*-lor prin testarea producerii de urează, manită și a mobilității.

Principiu

Proba: Colonii bine izolate și cu aspect sugestiv din primocultura pe medii selective ori diferențiale sau din primoculturi pure pe medii neselective.

Procedura: Prelevă cu firul de însămânțare o porțiune de colonie (de pe medii selective exclusiv de la suprafața coloniei). Însămânțează prin înțepare coloana de mediu. Incubează peste noapte la 37°C, iar tuburile nevirate în continuare până la 48 ore.

Citire și interpretare:

- Opacifiere numai în lungul traiectului de însămânțare = bacterie imobilă.
- Coloana de mediu opacifiată = bacterie mobilă.
- Coloana alcalinizată (albastră) = urează prezentă.
- Culoarea coloanei de mediu nemodificată = urează absentă.
- Virarea mediului în galben = manită pozitiv
- Culoarea coloanei de mediu nemodificată =manită negativ

Controlul de calitate:

Proteus mirabilis: mobilă, urează și indol pozitivă.

Shigella sonnei: imobilă, urează și indol negativă.

Test indol

Principiu:

Bacilii gram negativi care hidrolizează triptofanul produc indol, un produs care dezvoltă o culoare roșie prin adăugare de reactiv Kovacs (para-dimetilaminobenzaldehidă în alcool).

Însămânțare și incubare: se însămânțează tulpina de identificat în apa peptonată repartizată în eprubete de 12/120; incubare la 35°C timp de 18-24 ore.

Citire și interpretare

Producerea de indol:

Se adaugă câteva picături reactiv Kovacs fără agitare, cu citirea reacției după 1 min.

- dezvoltarea în faza alcoolică superioară a culorii roșu-rubiniu → tulpină indol-pozitivă;
- faza alcoolică rămâne incoloră → tulpină indol-negativă.

Control de calitate

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 11 din 14

- indol-negativ: *Proteus mirabilis*
- indol-pozitiv: *Escherichia coli*

Decarboxilarea lizinei

Principiu: bacilii gram-negativi din familia *Enterobacteriaceae*, care descompun lizina, fermentează inițial glucoza și crează un pH acid favorabil pentru acțiunea lizin-decarboxilazei care, în a doua fază, alcalinizează mediul prin aminele generate, cu intensificarea culorii purpuriu a indicatorului bromcrezol purpur.

Însămânțare și incubare: mediul cu lizină, repartizat în volum de 2-3 ml în eprubete de 10/100 mm este însămânțat cu tulpina de identificat. Incubare la 35°C cu examinare zilnică până la 4 zile.

Citire și interpretare:

- test pozitiv: mediul cu lizină virează în purpuriu;
- test negativ: mediul cu lizină virează în galben.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Salmonella enteritidis*
- martor negativ: *Proteus mirabilis*

Producerea de fenilalanindezaminază

Principiu: *Proteus*, *Morganella* și *Providencia* produc în mod caracteristic această enzimă care dezaminează fenilalanina cu generare de acid fenilpiruvic; prin adăugare de clorură ferică (soluție 10%) se dezvoltă o culoare verde.

Însămânțare și incubare: mediul cu fenilalanină repartizat în pantă în eprubete de 10/100mm este însămânțat abundent cu tulpina de identificat cu incubare la 35°C timp de 18-24 ore.

Citire și interpretare: se depun 4-5 picături de clorură ferică pe suprafața culturii:

- test pozitiv: suprafața pantei și lichidul de la baza pantei se colorează în câteva secunde în verde;
- test negativ: absența culorii verzi.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Proteus vulgaris*
- martor negativ: *Escherichia coli*

Utilizarea citratului

Principiu: unii bacili gram-negativi din familia *Enterobacteriaceae* pot utiliza citratul de sodiu ca unică sursă de carbon într-un mediu sintetic minimal pe care cresc și îl alcalinizează, cu virarea indicatorului albastru de brom-timol (mediul Simmons).

Însămânțare și incubare: se însămânțează pe suprafața mediului un striu din tulpina de identificat; incubare la 35°C cu examinare zilnică până la 7 zile.

Citire și interpretare:

- test pozitiv: striu de cultură și culoarea albastră a mediului;
- test negativ: absența culturii cu lipsa de virare a indicatorului (culoarea verde a mediului se menține).

Control de calitate

- martor pozitiv: *Klebsiella pneumoniae*
- martor negativ: *Escherichia coli*

Testul de mobilitate

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 12 din 14

Principiu: o tulpină însămânțată prin înțepare într-o coloană de mediu semisolid (agarizat 0,4%), cultivă numai pe traiectul de însămânțare dacă este imobilă sau difuzează în afara striului invadând mediu dacă este dotată cu flageli.

Însămânțare și incubare: însămânțează coloana de agar prin înțepare cu firul drept și incubează mediul la 35°C timp de 24-48 ore.

Citire și interpretare

- test pozitiv (bacterie mobilă): opacifierea progresivă a mediului în afara traiectului de însămânțare,
- test negativ: cultivarea strictă pe traiectul de însămânțare.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Salmonella Enteritidis*
- martor negativ: *Klebsiella pneumoniae*.

Testul oxidazei

Principiu: citocrom-oxidaza, enzimă respiratorie prezentă la bacterii gram-negative aerobe, facultativ anaerobe sau microaerofile, în prezența tetrametil-parafenilendiaminei, generează un compus de culoare purpurie.

Procedură: o colonie dintr-o cultură de 24-48 ore dezvoltată pe un mediu fără zaharuri în compoziție, prelevată cu ansa din plastic sau cu un bețișor din lemn este etalată în spot pe suprafața unei benzi impregnate cu reactiv.

Citire și interpretare

- test pozitiv: virajul spotului în culoare purpurie închis în interval de 10-15 sec.
- test negativ: absența culorii purpurii în primele 20 sec.

Control de calitate

- martor pozitiv: *Pseudomonas aeruginosa*
- martor negativ: *Escherichia coli*

Testul de oxidare-fermentare (OF)

Indicații: Diferențierea corinebacteriilor și genurilor înrudite, *Enterobacteriaceae*-lor aeromonadelor, pseudomonadelor și altor bacterii gram-negative nefermentative.

Principiu: Bacteriile pot cataboliza glucoza fermentativ și/sau oxidativ, acidul piruvic fiind intermediarul cheie al ambelor căi metabolice. În fermentare transferul de electroni de la acidul piruvic la alți compuși organici generează mai mulți acizi care determină o importantă scădere de pH. În oxidare, acidul piruvic este antrenat în ciclul Krebs, iar transferul de electroni se face către oxigen cu apariția în final a apei. Acizii generați în ciclul Krebs sunt acizi slabi, care determină, comparativ cu acizii generați în fermentație, numai o ușoară acidifiere a mediului.

Hugh și Leifson au conceput mediul OF tocmai pentru a surprinde aceste variații ale pH-ului în raport cu calea de catabolizare oxidativă sau fermentativă a glucozei: (1) Conținutul scăzut de peptonă previne formarea de amine alcaline care ar putea neutraliza acizii din ciclul Krebs, (2) Conținutul 1% de glucoza generează suficienți acizi în calea oxidativă pentru a determina o scădere de pH sesizabilă prin albastrul de bromtimol inclus ca indicator. (3) Semigelificarea cu agar 0,3% localizează satisfăcător acizii formați. (4) Utilizarea în paralel a două tuburi, dintre care unul are mediul acoperit cu ulei de parafină, iar celălalt mediul în contact direct, cu oxigenul asigură condiții anaerobe, favorabile fermentării și, respectiv aerobe, favorabile oxidării.

Proba: Colonii din cultura pură pe mediul agarizat.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 13 din 14

Procedura: Regenerează, pentru îndepărtarea aerului, un set dublu de tuburi față de numărul tulpinilor testate. Răcește brusc și însămânțează prin înțepare cu firul drept în profunzimea coloanei fiecare tulpină în două tuburi. Incubează un set de tuburi aerob, celălalt anaerob sub strat de ulei mineral steril de 1,5-2cm înălțime. Urmărește tuburile zilnic timp de 14 zile.

Citire și interpretare:

Rezultatul	Tubul aerob	Tubul anaerob
Oxidare	acid	fără acidifiere
Fermentare	acid	acid
Inactiv	fără acidifiere	fără acidifiere

Mediul O-F depistează de asemenea producerea de gaz din glucoza și mobilitatea.

Controlul de calitate:

Oxidare: *Acinetobacter calcoaceticus/Burkholderia cepacia*.

Fermentare: *Escherichia coli*.

Inactiv: *Alcaligenes faecalis/Acinetobacter lwoffii*.

Testul de filamentare

Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conține 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, se efectuează un preparat lamă-lamelă din suspensia obținută și se urmărește la microscop apariția tubilor germintivi (filament care emerg din blastospor fără strangulare).

Candida albicans dă testul de filamentare pozitiv.

5.4. ACTIVITATI FINALE

- plăcile din plastic cu culturi bacteriene sunt colectate în saci din plastic de culoare galbenă și apoi transportate la incinerator;
- materialele din sticlă recuperabile (plăci Petri, eprubete) sunt sterilizate, după folosire; la autoclav, spălate și reintroduse în circuit.

6. RESPONSABILITĂȚI

6.1. Responsabilul de analiză

Citește și consemnează rezultatele testelor biochimice și le interpretează în contextul unor teste suplimentare de identificare (caractere morfo-tinctoriale, mobilitate, fenotipuri de rezistență la antibiotice);

6.2. Asistentul de laborator

Repartizează mediile de identificare și răspunde de asigurarea parametrilor fizici și de sterilitate.

Asigură conservarea mediilor în condiții corespunzătoare până în momentul utilizării.

Efectuează testele biochimice de identificare.

6.3. Personalul de îngrijire

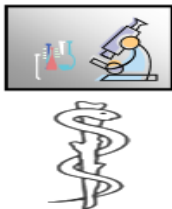
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ IDENTIFICAREA MICROGANISMELOR COD: POL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 14 din 14

Execută și întreține curățenia în laborator;
Colectează și depozitează reziduurile de probe și deșeurile auxiliare.

7. INREGISTRARI

- registre de analiză;
- buletin de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA OPERAȚIONALĂ

COLORAREA FROTIURILOR

COD: POL – M1 - 02

Ediția 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborilă

ELABORAT
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 9

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager General	1.		Prof.Dr. Carmen Dorobăț					
Manager Tehnic	2		Dr. Rodica Fântânanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 3 din 9

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 9

CUPRINS

- 1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
 - 5.1. CONDIȚII PREALABILE
 - 5.2. RESURSE NECESARE
 - 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
 - 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
 - 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 9

1. SCOPUL

Procedura descrie modul de realizare a coloratiilor in microbiologie.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele truselor de reactivi si coloranti

4.DEFINIȚII SI ABREVIERI

4.1.Definiții

Frotiul reprezintă materialul microbian etalat in strat subtire pe suprafața unei lame de microscop.

4.2. Abrevieri

ZN = Ziehl- Neelsen

BAAR = bacili acido- alcoolo-rezistenti

5. DESCRIEREA PROCEDURII

Pentru efectuarea frotiului se folosesc lame curate și degresate care se marchează la una dintre extremități cu indicativul produsului ce urmează a fi examinat.

Efectuarea propriu-zisă a frotiului are trei timpi:

a) etalarea:

-se etalează o ansă din produsul patologic fluid sau din cultura bacteriană în mediu lichid în strat subțire și uniform pe 1-2 cm² în centrul lamei, cu mișcări lente ale ansei.

-în cazul exsudatelor fibrino-muco-purulente etalarea unui flocon se realizează prin mișcări circulare concentrice spre exterior, evitând dilacerarea structurilor celulare prin mișcări de du-te-vino ale ansei.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 9

-când produsul biologic este prelevat pe tampon, se rulează tamponul pe suprafața lamei, evitând distrugerea elementelor celulare prin exercitarea unor presiuni prea mari în timpul efectuării frotiului

-în cazul culturii bacteriene pe medii solide se realizează o suspensie omogenă din colonia bacteriană de testat într-o picătură de soluție salină izotonă depusă în centrul lamei, care apoi se etalează în strat subțire

- în cazul fragmentelor de țesuturi se efectuează amprente: pe suprafața de secțiune a țesutului se aplică lama în așa fel încât pe porțiunea ei centrală să rămână amprenta țesutului

b) uscarea: la temperatura camerei sau de preferat pe o suprafață încălzită (ce nu depășește 70°C)

c) fixarea prin căldură: lama cu frotiul uscat în sus este trecută de câteva ori prin flacăra unui bec de gaz timp de 5-10 sec. Temperatura de fixare nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu distorsiona elementele structurale ale bacteriilor (temperatura lamei trebuie să fie suportabilă când o atingem pe tegumentul feței dorsale a mâinii).

Pentru studierea caracterelor microscopice (dimensiuni, formă, așezare) și identificarea afinității tinctoriale a bacteriilor prezente în produsele patologice sau a celor izolate pe mediile de cultură sunt examinate frotiuri colorate prin diferite tehnici de colorare:

- Colorația simplă cu albastru de metilen
- Colorația diferențială Gram

5.1. Colorația simplă cu albastru de metilen

Frotiurile din produs patologic sau din coloniile izolate pe mediile de cultură se acoperă cu soluție de albastru de metilen, se lasă timp de 1 minut, apoi se spală cu apă (până când apa de spălare curge curată), se usucă la temperatura camerei și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Citirea și interpretarea:

Bacteriile apar colorate în albastru închis; celulele inflamatorii și cele de descumare cu nuanțe de albastru, mai închis nucleul, deschis citoplasma.

5.2. Colorația diferențială Gram

Principiu:

După tratarea bacteriilor cu un colorant bazic violet din seria pararozanilinei și cu iod, ele se comportă diferit sub acțiunea unui agent decolorant (alcool, acetona).

La unele iodul fixează colorantul și împiedică decolorarea, astfel încât bacteriile rămân colorate în violet și au fost denumite gram pozitive.

Alte bacterii se decolorează și trebuie colorate cu un colorant diferit, uzual roșu (fuxină, safranină) și se numesc gram negative.

Procedura

Frotiurile efectuate din produse patologice sau din coloniile izolate pe mediile de cultură se colorează prin tehnica Gram respectând următoarele etape ale colorației:

- a) colorarea cu soluție de violet de metil timp de 1 minut;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași	PROCEDURA OPERATIONALA	Editia 1
Laboratorul de analize medicale	COLORAREA FROTIURILOR	Revizia 0
	COD: POL – M1 - 02	Exemplar nr.
		pag. 7 din 9

- b) spălare cu apă;
- c) fixare cu soluție iodo-iodurată Lugol: acoperirea lamei cu soluție și menținerea timp de 2 minute, apoi scurgerea soluției de pe lamă (fără spălare);
- d) decolorarea cu un amestec de alcool etilic (96°) și acetonă (100%), timp de 5-10 secunde (în funcție de grosimea frotiului): se acoperă lama cu amestecul decolorant și se imprimă mișcări alternative de înclinare până când preparatul nu mai eliberează colorant;
- e) spălare cu apă;
- f) recolorarea cu fucsină bazică 0,1% timp de 30 secunde, prelungit până la 1-2 minute pentru colorarea hemofililor.;
- g) spălare cu apă, uscare.

Controlul de calitate:

Martor pozitiv: *S. aureus* ATCC 25923

Martor negativ: *E. coli* ATCC 25922

Pentru fiecare lot nou de colorant sau amestec decolorant se efectuează, colorează și examinează un frotiu martor. Acesta se realizează dintr-o suspensie de *E. coli* și *S. aureus* din culturi proaspete de o zi, iar pe acest frotiu diferența dintre bacilii gram-negativi și cocci gram-pozitivi trebuie să fie netă.

Citirea și interpretarea:

- bacteriile gram-pozitive și fibrina apar colorate în violet;
 - bacteriile gram-negative, în roșu,
 - nucleul și citoplasma celulelor inflamatorii și celulelor tisulare, în nuanțe de roșu.
- Pe frotiurile etalate neuniform, pot alterna câmpuri sub- sau supradecolorate. Se selectează pentru examinare câmpurile cu leucocite roșii; dacă alături de acestea se observă bacterii violete, câmpul este corect diferențiat.

5.3. Coloratia Ziehl-Neelsen

Indicații

Colorația micobacteriilor din produse patologice sau din cultură.

Reactivi

- Soluția de fucsină fenicată Ziehl
- Soluția decolorantă 20% de acid sulfuric
- Alcool etilic 95°
- Soluția recolorantă : albastru de metilen Löffler.

Procedura

- Se acoperă lama cu soluție de fucsină Ziehl.
- Cu lampa de spirit se încălzește fața inferioară a lamei până la emisie de vapori. Se repetă încălzirea la intervale de un minut timp de 5 minute.
- Se spală lama abundant cu apă de la robinet
- Se acoperă lama cu soluție de acid sulfuric 20% timp de 1 minut. Culoarea roșie a frotiului devine galben brună. După un minut se varsă decolorantul și se spală lama. Frotiul trebuie să rămână ușor roz. La nevoie, se poate repeta acest timp.
- Se spală bine cu apa de robinet.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 9

Se recolorează frotiul cu albastru de metilen Löffler timp de un minut.
Se spală cu apa de robinet și se usucă.

Citire si interpretare

Bacilii acido alcoolo-rezistenti apar roșii strălucitori.
Celulele inflamatorii, celulele de descumare și bacilii neacido-rezistenți în nuanțe de albastru.

Controlul de calitate

Martor pozitiv : *Mycobacterium tuberculosis*

Martor negativ : *Corynebacterium* spp

Rezultate fals pozitive apar în cazul existenței de micobacterii saprofite în conductele și rezervoarele de apă sau în soluții păstrate în laborator.

5.4. Colorația Giemsa rapidă

Indicatii

Evidențiază *Pneumocystis* (în sediment de spălătură bronșică), *Histoplasma capsulatum* (în puroi, sediment de spută), incluzii de *Chlamydia trachomatis* în prelevate de la bolnavi.

Reactivi

- fixator : alcool metilic absolut
- Colorant Giemsa soluție stoc
- Dilutia 1/20 a soluției Giemsa preparată zilnic.

Procedura

Se usucă frotiurile 30 minute în aer.
Se fixează cu alcool metilic absolut timp de un minut.
Se scurge și se usucă în aer.
Se colorează timp de 30 minute cu diluția de lucru a soluției Giemsa.
Se clătește cu apă.
Se usucă în aer și se examinează.

Citire și interpretare

Pneumocystis carinii – formele trofice apar cu nucleul roșu și citoplasma albastră. Chiștii rămân cu peretele necolorat, vizibil doar ca un halou, dar nucleii lor apar roșii.

Histoplasma capsulatum apare în citoplasma macrofagelor sau polimorfonuclearelor ca levuri colorate în roșu.

În exsudatele bronhoalveolare, colorația Giemsa mai poate evidenția : *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*.

Incluziunile de *Chlamydia trachomatis* trebuie căutate în celulele epiteliale columnare. Inițial apar albastre, iar la maturitate devin roșii, cresc în volum au aspectul unei vezicule citoplasmice compacte, care deplasează nucleul celulei la periferie.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA OPERATIONALA COLORAREA FROTIURILOR COD: POL – M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 9

Controlul de calitate

Prin depistarea macrofagelor alveolare și a celulelor bronsice , colorația Giemsa permite controlul de calitate al spălăturii bronhoalveolare pentru depistarea fungilor și a altor paraziți.

6. RESPONSABILITĂȚI

6.1. Responsabilul de analiză

- examinează frotiurile colorate și consemnează rezultatele în caietele de lucru
- verifică înscrierea rezultatelor în buletinul de analiză, pe care îl semnează și parafează.
- înregistrează rezultatele în registrul în care sunt înscrise probele primite în laborator

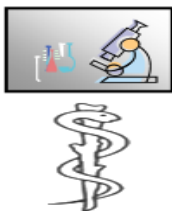
6.2. Asistentul

- efectuează frotiurile și colorarea lor
- asigură dezinfecția suprafețelor de lucru

7. ÎNREGISTRĂRI

- registre de analiză;
- buletin de analiză

8. ANEXE



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

**PROCEDURA SPECIFICĂ
EXAMEN LICHIDE DE PUNCȚIE**

COD: PSL – M1 - 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânanu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Dr. Olga Filip

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 17

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânanu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 3 din 17

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 17

CUPRINS

1. SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
 - 5.1. CONDIȚII PREALABILE
 - 5.2. RESURSE NECESARE
 - 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
 - 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
 - 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 17

1. SCOPUL

Procedura descrie activitățile și etapele privind prelucrarea lichidelor de puncție (lichidul cefalorahidian, pleural, pericardic, articular si peritoneal) în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în meningo-encefalite, artrite, pleurezii, pericardite si peritonite.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII , Cod: MCL – 01
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definitii

4.1.1. Lichid cefalorahidian: produs biologic/ patologic obținut prin rahicenteză, uzual lombară sau puncție ventriculară, in condiții aseptice. LCR normal e un fluid steril, incolor si clar, care conține cel mult 3 celule nucleate/mmc, 50-70 mg glucoză/dl, 15-40 mg proteine/dl si 680-730 mg cloruri/dl. Se recoltează de către clinician, la patul bolnavului, de preferat înainte de administrarea antibioticelor.

După prezentarea clinică, meningitele bacteriene pot fi acute (când debutul simptomelor este cu cel mult 24 ore in urmă) sau cronice (simptomatologia durează minim 4 săptămâni).

Etiologia meningitelor

Cele mai frecvente bacterii implicate in determinarea meningitei acute sunt: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*,

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 17

Streptococcus agalactiae, *Staphylococcus aureus*, bacili gram negativi. Meningita acută corelată cu șunt LCR este determinată de: stafilococi coagulazo-negativi, *S.aureus*, *Enterobacteriaceae* și BGN nonfermentativi. În etiologia meningitei cronice (pleiocitoză cu Lf) sunt implicate următoarele bacterii: *Nocardia asteroides*, *Brucella* spp, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*. Meningitele fungice (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*) sunt rare și apar la gazda imunocompromisă. Meningitele virale sunt relativ frecvente și evoluează de obicei benign, chiar dacă nu beneficiază de tratament antiviral.

4.1.2. Alte lichide de puncție

a. Lichidul pleural

În mod normal, lichidul pleural conține câteva celule și are o consistență similară cu a serului, dar cu un conținut redus de proteine. Când crește cantitatea de lichid apare transudatul, ca rezultat al unei afecțiuni cardiace, renale sau hepatice. Exsudatul pleural conține numeroase leucocite și alte semne de inflamație și apare în infecții, afecțiuni maligne, infarct pulmonar sau boala autoimună. Empiemul este un exsudat ce conține numeroase PMN și este purulent macroscopic, fiind determinat de pneumonii sau infecții subdiafragmatice.

b. Lichidul peritoneal

Reprezintă o cantitate mică de lichid ce există în cavitatea peritoneală și în mod normal are un conținut redus de proteine și rare leucocite. Ca urmare a unui proces inflamator sau infecțios, crește cantitatea de lichid peritoneal, provocând ascită.

În peritonita primară nu există un focar de infecție evident; este determinată la copii de pneumococi, streptococi de grup A, enterobacteriacee, stafilococi, la adulți de *Escherichia coli*, pneumococi, iar la femei active sexual poate fi determinată de: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*. Peritonita secundară apare după perforația unui viscer, posttraumatic sau postoperator, având ca etiologie o asociere de bacterii anaerobe, enterobacteriacee, enterococi sau alți streptococi.

c. Lichidul pericardic

Spatiul dintre epicard și pericard conține în mod normal 15-20 ml lichid clar.

Etiologia pericarditei este determinată de: virusuri (enterovirusuri, adenovirusuri), rar bacterii (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*), fungi (*Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*) sau paraziți (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*).

d. Lichidul articular

Artrita infecțioasă poate afecta orice articulație a organismului, având ca agenți etiologici: *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* (la tineri sub 30 ani), *Haemophilus influenzae* (copii sub 2 ani), streptococi grup A și B, pneumococi

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 7 din 17

4.2. Abrevieri

AS: mediu agar cu 5 % sânge;
Ach: agar chocolate;
BCC: bulion cord creier;
Ecn: elemente celulare nucleate;
LCR: lichid cefalorahidian;
LPI: lichid pleural;
LA: lichid de ascită;
LPe: lichid pericardic;
LS: lichid sinovial (articular).
PMN: polimorfonucleare neutrofile
H: hematii
L: leucocite

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Conditii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecție și va respecta normele de protecția muncii și de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură, coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice, conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator conform IL- , Ed.1, Rev0/.....

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar seria
- termostat
- frigider;
- lampa UV
- microscop optic

Resurse

- anse;
- lame microscop;
- camera de numărare Fuchs-Rosenthal;
- ulei de cedru;
- bec de gaz Bunsen;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 17

- baie colorare;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
- pense;
- pipete automate;
- pipete sterile;
- varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
- lame/lamele;
- eprubete sterile de 10/10;
- stative eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar chocolate, agar Mac Conkey, agar Sabouraud;
- materiale de control, tulpini de referință;
- discuri pentru antibiogramă;
- trusa de latexaglutinare pentru diagnosticul meningitelor;
- trusa de coloratie Gram, albastru de metilen și May-Grunwald-Giemsa;
- ser fiziologic;
- soluții dezinfectante;
- tulpini de referință.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime turnat in placă, pH-ul mediului, sterilitatea,etc).

5.3. Continutul procedurii

Principiul biologic care stă la baza examinării LCR/ lichidelor de puncție constă în recoltarea și cultivarea produsului patologic, izolarea, identificarea agentului patogen și determinarea sensibilității la antibiotice.

5.3.1. Recoltarea

Lichidul cefalorahidian se recoltează de către clinician la patul bolnavului, în volum de 5-10 ml, repartizat in 2-3 eprubete sterile. Tuburile recoltate se etichetează la patul bolnavului și sunt trimise la laborator împreună cu cererea de analiză, ce trebuie sa cuprindă: nume si prenume, vârsta, diagnostic și dacă pacientul este sub tratament cu antibiotice.

Celelalte lichide de puncție se recoltează prin puncție cu seringă in condiții de asepsie, fiind necesari 10-15 ml în cazul lichidelor pleurale si peritoneale si 4-5 ml pentru cele articulare.

5.3.2. Transportul

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 17

Proba se transportă imediat și fără refrigerare la laborator. Temporizarea examinării distruge celulele (leucocitele polimorfonucleare scad cu ~50% la 1 oră după prelevare), iar refrigerarea omoară meningococii.

În afara programului normal de lucru proba de LCR, lichid de puncție se păstrează în termostatul de gardă.

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Medicul care deservește compartimentul de microbiologie 1 preia eprubetele cu LCR/lichid de puncție și formularele de solicitare analize, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notând date de identificare pacient, analiza și numele operatorului.

Când cantitatea de LCR primită în laborator apare insuficientă, prioritatea investigațiilor trebuie stabilită de comun acord cu medicul care a solicitat examinarea.

Etapele examenului microbiologic sunt:

5.3.3.1. Examenul macroscopic

Se apreciază:

- Transparența: clar/ opalescent/ tulbure/ purulent. Se examinează proba, comparativ cu apa de robinet, în tuburi identice aplicate pe un text tipărit cu litere negre. Probele care au sub 150 celule/mm³ sunt clare. Opalescența poate fi sesizată dacă lichidul conține >200 polimorfonucleare sau 400 limfocite sau 800 hematii/mm³. Lichidul devine tulbure dacă are peste 1000 celule/mm³, iar la peste 10.000 celule/mm³ are aspect purulent.

- Culoarea: incolor/ roșu opalescent/ roșu transparent (lacat)/ xantocrom; citirea este repetată și după centrifugarea probei, cu aprecierea culorii supernatantului și sedimentului. LCR este roșu opalescent în hemoragii meningiene, defect de puncție sau meningite cu lichid hemoragic (cărbunoasa sau leptospirotică). Aspectul lacat și xantocrom apar în hemoragii meningiene mai vechi.

- Fluiditatea. LCR normal e fluid ca apa. Probele purulente sunt vâscoase; unele pot coagula sau prezintă numai vâl de fibrină. Vâlul fibrinos apare în meningita tuberculoasă, rar în cea virală sau neoplazică. Trebuie evitată coagularea lichidelor de puncție, prin adăugarea unei cantități mici de heparină.

5.3.3.2. Examenul microscopic

a. Examenul citologic cantitativ (numărarea elementelor din lichidul de puncție)

Se execută în cazul probelor de lichid cu aspect clar, opalescent, tulbure sau hemoragic; se pot exclude probele purulente.

Numărătoarea elementelor din lichidul de puncție se face pe o cameră de numărat Fuchs Rosenthal:

- după agitarea probei se aspiră o cantitate mică de lichid cu o pipetă sterilă și se depune o picătură pe cameră la marginea lamei pe coloana centrală. Lichidul difuzează prin capilaritate și acoperă rețeaua.

- se lasă să sedimenteze câteva minute, apoi se examinează la microscop;

- se numără la microscop cu obiectivul 20.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 10 din 17

- când reacția inflamatorie e mică/ moderată, se numără elementele inflamatorii de pe suprafața întregii rețele, rezultatul se împarte la 3 și se obține numărul de elemente pe mmc. Se numără numai elementele inflamatorii, niciodată hematiile. Când există hematii la examenul microscopic, se semnalează prezența acestora.

- când reacția inflamatorie e mai importantă, se numără elementele de pe 4 pătrate mari, rezultatul se înmulțește cu 4 și se împarte la 3, obținându-se numărul de elemente pe mmc;

- în cazul lichidelor hematice, e folosește o picătură de acid acetic glacial; acesta lizează hematiile și lasă numai leucocitele, care se numără.

Corecția pentru leucocite (sânge prezent în probă):

$L/mmc\ LCR = L/mmc\ sânge \times H/mmc\ LCR / H/mmc\ sânge$

b. Examenul citologic calitativ (determinarea tipului de celule din sediment)

- Se efectuează un frotiu din o picătură de lichid, fără etalare, depusă pe o lamă nouă de microscop sau după centrifugarea lichidului.

- o eprubetă cu lichidul de puncție se centrifughează 10 minute la 3000 rotații/minut;

- se decantează supernatantul la flacără în altă eprubetă;

- se omogenizează sedimentul în cele câteva picături (0,5-1ml sediment) ce se scurg din eprubetă;

- din sediment se efectuează 3 frotiuri pe lame curate (de preferat noi) și culturi (din probele purulente frotiul se efectuează direct, fără centrifugare);

- frotiurile se usucă la temperatura camerei, apoi se fixează și se colorează unul cu albastru de metilen/May-Grunwald-Giemsa, unul gram, iar unul este de rezervă.

- primul frotiu se colorează cu albastru de metilen 3-5 minute, apoi se spală, se usucă și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie. Se numără diferențiat polimorfonuclearele neutrofile (PMN), limfocitele (Lf) și macrofagele (Mf) pentru a stabili formula procentuală a reacției inflamatorii. Se notează aspectul celulelor: PMN nealterate indică un proces septic acut sau o infecție tuberculoasă la debut, Lf apar în infecții cronice sau de vecinătate, iar eozinofilele exprimă o reacție alergică sau parazitară; rare celule epiteliale se evidențiază în transudate. La nou-născuți și sugari, diagnosticul de meningita bacteriană acută este acceptat în prezența a >8 celule nucleate/mmc sau a cel puțin 1 PMN/mmc.

c. Bacterioscopia

- al doilea frotiu se colorează gram și evidențiază caracterele morfotinctoriale ale microorganismelor, frecvența și localizarea.

- în suspiciunea de meningită tuberculoasă, se efectuează un frotiu în straturi suprapuse și se colorează Ziehl-Neelsen;

- se poate efectua și preparat lama-lamelă pentru depistarea și identificarea microscopică a criptococilor, amibelor și leptospirelor din LCR.

Bacterioscopia pe frotiurile colorate cu albastru de metilen este frecvent mai sensibilă decât cea pe frotiuri colorate gram.

Aspectul frotiurilor pentru microorganismele mai frecvent întâlnite în etiologia meningitelor:

– *Neisseria meningitidis* apare sub formă de diplococi gram negativi, cu marginile adiacente aplatizate (dispuși în boabe de cafea), extra- și intracelulari. Evidențierea lor

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 11 din 17

pe frotiurile colorate gram este uneori mai dificilă din cauza colorației asemănătoare cu a detrisurilor celulare.

- *Streptococcus pneumoniae* se colorează gram pozitiv, având forma de diplococi lanceolați, frecvent capsulați.
- *Haemophilus influenzae* : cocobacili sau bacili scurți, drepecți, rar incurbați, uneori polimorfi, cu sau fără filamente, gram negativi.
- Alți bacili gram negativi: majoritatea sunt enterobacterii, care nu prezintă nimic tipic din punct de vedere morfologic. Bacteriile din grupul *Acinetobacter* sunt morfologic foarte asemănători cu *Neisseria meningitidis*.
- *Listeria monocytogenes* apare în frotiul direct din LCR sub formă de cocobacili gram pozitivi izolați, în perechi sau în lanțuri scurte.
- *Cryptococcus neoformans*: levuri rotunde sau ovale, in mugurite, gram pozitive și înconjurate de un halou mare incolor.

5.3.3.3. Depistarea antigenică

Sunt disponibile teste rapide pentru depistarea antigenelor bacteriene (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tip b, streptococi de grup B, *Escherichia coli*) în supernatantul LCR sau în lichidul ca atare.

Testul de latexaglutinare detectează în ~20 minute antigene bacteriene în cantități de ng/ml. Tehnica de lucru este conform prospectului din trusă. Reacția se efectuează pe probe de LCR încălzite 5 minute în baie de apă la fierbere; proba încălzită se centrifughează 10 minute la 3000 turații/ minut, iar supernatantul este folosit pentru reacția de latexaglutinare cu antigen de meningococ grup A, B, C, pneumococ, *Haemophilus influenzae* b și *Streptococcus agalactiae*.

5.3.3.4. Cultivarea

Medii de cultură folosite:

- AS- agar Columbia sau agar nutritiv cu 5% sânge de berbec;
- Ach- agar chocolate;
- BCC- bulion cord-creier;
- Mediul Sabouraud
- este un mijloc de diagnostic specific, dar necesită 24-48 ore și poate fi negativă în cazul prezenței germenilor neviabili, etiologiei virale sau dacă pacientul este pretratată cu antibiotice.
- se însămânțează 1-2 picături din sedimentul LCR/ alte lichide sau direct din lichidele purulente pe medii preîncălzite la termostat: câte o placă cu mediu Columbia cu 5% sânge, o placă cu agar șocolat și un tub cu bulion cord creier și se incubează la 37°C, în atmosfera cu 5% bioxid de carbon. Se urmărește zilnic apariția culturii, timp de 2 zile pe mediile solide și 5 zile în tubul cu BCC. Însămânțarea plăcii cu agar-chocolat nu este necesară când bacterioscopia a depistat bacterii gram pozitive.
- în funcție de suspiciunea clinică și de bacterioscopie, se pot adăuga și alte medii.
- când se presupune etiologia tuberculoasă, se însămânțează sedimentul LCR centrifugat 30 minute la 3000 G pe un tub cu mediu Lowenstein-Jensen; se incubează tuburile aerob la 37°C în poziție înclinată 24 ore, apoi în poziție verticală. După 14 zile de incubare se urmărește apariția culturii săptămânal până la 8 săptămâni.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 12 din 17

- pentru cultivarea fungilor se însămânțează 1-2 picături din sedimentul de lichid pe o placă cu mediu Sabouraud și se incubează la 30° C.

Citirea culturilor

A doua zi

- Se urmărește apariția culturilor pe mediile solide și lichide.
- În cazul culturilor pozitive se continuă identificarea până la nivel de specie și se efectuează antibiograma; dacă se pozitivă cultura numai pe BCC, se fac frotiuri și repicări pe medii solide AS și Ach, cu incubare 24 ore la 37 grade. În cazul în care se constată lipsa creșterii pe toate mediile, acestea se reincubează și se examinează zilnic timp de 5 zile.
- În suspiciunea unei infecții cu anaerobi, recoltarea se face în recipiente speciale ce mențin condițiile de anaerobioză.

5.3.3.5. Identificarea izolatelor se face prin:

- Examen microscopic;
- Caractere de cultură;
- Caractere biochimice;
- Caractere antigenice.

Pentru identificare se efectuează frotiu din cultură și se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la meningococi și *Pseudomonas aeruginosa*), latexaglutinare din cultură, testul de sensibilitate la Optochin (pozitiv pentru pneumococi), testul coagulazei (pentru stafilococi), test de filamentare pentru levuri. Se poate face identificare automată pe galerie API.

Neisseria meningitidis

- Examen microscopic: diplococi gram negativi, cu diametrul de 0,6-1 mm, fețele adiacente reniforme sau aplatizate (în boabe de cafea);
- Caractere de cultură: pe AS sau Ach, după 24-48 ore incubare în atmosferă de CO₂ la 37 grade, formează colonii S transparente, de 1-2 mm diametru;
- Caractere biochimice: testul oxidazei pozitiv;
- Latexaglutinarea poate identifica meningococii de grup A, B, C, Y, W135.

Streptococcus pneumoniae

- Examen microscopic: coci gram pozitivi, lanceolați, frecvent capsulați, dispuși în diplo și în scurte lanțuri;
- Caractere de cultură: pe AS formează colonii gri-opace, alfa-hemolitice, cu diametrul de ~1 mm, care pot autoliza în câteva ore, devenind crateriforme. Tulpinile capsulate formează colonii transparente mucoide. Pe mediile lichide pneumococii cresc, tulburând omogen mediul.
- Testul de sensibilitate la optochin diferențiază prezumtiv streptococii alfa-hemolitici în pneumococi, sensibili (diametrul zonei de inhibiție >14 mm) și streptococi viridans, rezistenți.

Haemophilus influenzae

- Examen microscopic: cocobacili gram negativi polimorfi;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 13 din 17

-Caractere de cultură: pe Ach, în atmosfera cu CO₂, formează colonii gri-lucioase sau semiopace, netede, plane sau convexe, cu margini precise și diametrul de 1-2 mm, rotunde, convexe, transparente sau albastru-verzui.

Enterobacteriaceae

-Examen microscopic: bacili gram negativi

-Caractere de cultură: Fiind nepretențioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S” de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafața netedă și margini regulate sau colonii „R”, rotunde, plate, cu suprafața rugoasă și margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S” tulbură uniform mediul, iar formele „R” tulbură mediul în grade diferite, cu inel și depozit.

-Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei și producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate și producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilaza, citrat dehidrogenaza și fenilalanildezaminaza. Se poate face și identificarea automată pe galerii API.

Staphylococcus aureus

-Examen microscopic: stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuși în grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

-Caractere de cultură: Obișnuit, coloniile de *S. aureus*, după incubare 18 ore la 37 °C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafața netedă, bombată și lucioasă. Pe AS cu 5% sange de berbec coloniile au o zonă circulară de hemoliză în jur. Prezența pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristică a tulpinilor de *S. aureus*, dar și a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus*, *S. hominis*). Pigmentogeneza necesită prezența oxigenului și este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

-Testul catalazei: Stafilococii dau testul catalazei pozitiv; prin suspensionarea culturii de stafilococ într-o picătură din soluția 20% de peroxid de hidrogen pe o lamă de sticlă, apar bule de gaz.

-Testul coagulazei: Identificarea rapidă a speciei se face cu ajutorul reactivilor comerciali de aglutinare. Reactivii sensibilizați cu fibrinogen și IgG cuplează coagulaza legată respectiv proteina A din peretele *S. aureus*, ducând la aglutinarea amestecului dintre reactiv și cultura de *S. aureus*.

Listeria monocytogenes

-Examen microscopic: cocobacili sau bacili gram pozitivi, nesporulați; în culturile vechi predomină formele bacilare lungi și filamentoase.

-Caractere de cultură: Pe geloză sânge coloniile sunt de dimensiuni mici, 1-1,5 mm și apar adeseori înconjurate de beta hemoliză. Cultivă la temperaturi între 0 și 45 grade, optim la 20 – 37.

Candida albicans

-Examen microscopic: celule ovale, gram pozitive, unele în mugurite

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 14 din 17

-Caractere de cultură: pe mediul Sabouraud formează colonii mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.

-Testul de filamentare: Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conține 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, se efectuează un preparat lama-lamelă din suspensia obținută și se urmărește la microscop apariția filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

Cryptococcus neoformans

-Examen microscopic: celule sferice, cu dimensiuni variabile de la 2 la 15 microni, izolate sau înmugurite, de obicei capsulate.

-Caractere de cultură: Pe mediul Sabouraud formează după incubare 24-48 ore la 37 grade colonii albe, cremoase.

-Testul ureazei pozitiv.

-Identificarea definitivă se realizează folosind o galerie de identificare API Candida sau ID 32 C.

2.2.4.5. Antibiotograma

Antibiotograma se poate efectua pe cultură primară dacă la microscopia directă se evidențiază o densitate bacteriană suficientă (zeci de bacterii pe câmp microscopic la examinarea cu imersie x 1000). Rezultatele vor fi confirmate prin antibiotograma pe subcultura standardizată. Este de preferat testarea cantitativă celei difuzimetrice. Se efectuează E test la penicilină și cefotaximă pentru meningococii, pneumococii și streptococii izolați din LCR.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Interpretare rezultate

Pentru identificarea microorganismului patogen se face corelarea caracterelor microscopice, de cultură, biochimice și antigenice.

Comunicarea rezultatelor

Tratamentul antimicrobian al meningitelor reprezintă o urgență și este inițiat pe baza raționamentului clinico-epidemiologic. Comunicarea etapizată a rezultatelor poate orienta mai țintit acest tratament. De aceea, se comunică telefonic imediat ce se obțin rezultatele examenului macroscopic, citologic, bacterioscopic și al reacției de latexaglutinare, urmând a fi completat buletinul de analiză al etapei.

Examenul macroscopic

Se notează: transparența (lichid clar/ opalescent/ tulbure/ purulent);

-culoarea (incolor, hemoragic, lacat sau xantocrom);

-fluiditatea (fluid, vâscos sau cu vâl de fibrină).

Examenul microscopic

a. Examenul citologic cantitativ

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 15 din 17

Citologia cantitativă este esențială pentru probele de LCR clare, opalescente sau tulburi. Se poate renunța la ea în cazul probelor purulente.

Se comunică numărul de elemente celulare nucleate/mmc (de ex: 750 ecn/mmc).

Dacă sunt mai puțin de 3 ecn/ mmc, rezultatul se va comunica astfel: "absența reacției inflamatorii".

Un lichid normal conține 0-5 ecn/mmc, de obicei limfocite. Numărul leucocitelor crește variabil în funcție de natura și stadiul evolutiv al meningitei:

-50- 1000 /mmc în meningitele acute virale

-50- 500/mmc în meningita tuberculoasă

~10.000 ecn/mmc în meningitele acute bacteriene și în abcesul cerebral.

b. Examenul citologic calitativ

Se comunică formula procentuală a reacției inflamatorii, cu precizarea procentului de polimorfonucleare, limfocite, macrofage (și celule mezoteliale în alte lichide de puncție, ca LA).

În meningita bacteriană acută apare reacție inflamatorie cu PMN, care virează spre o reacție cu limfocite pe măsură ce procesul infecțios dispare. Meningitele virale sunt caracterizate de o reacție inflamatorie de tip limfocitar (în faza precoce poate exista reacție cu PMN). În meningita tuberculoasă reacția celulară este cu predominanță limfocitelor, dar există și un procent redus de PMN. În meningita leptospirică, proporția de PMN și limfocite este variabilă.

c. Bacterioscopia

Anunțarea rezultatelor bacterioscopiei directe are un caracter de urgență și va face referiri la morfologia microorganismelor (coci, bacili, cocobacili, filamente, prezența de capsulă, spori), caracterul gram, acidoalcoolorезistența, frecvența (foarte rari, rari, frecvenți, numeroși) și raportul acestora cu elementele celulare (extra-sau intracelulare).

Bacterioscopia pe frotiuri colorate cu albastru de metilen este mai sensibilă decât cea pe frotiuri colorate gram. Sensibilitatea depistării BAAR crește pe frotiuri efectuate în straturi suprapuse.

Reacția de latexaglutinare

Se comunică rezultatul în urgență, precizând dacă este negativă sau pozitivă cu: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* grup A,B,C,Y sau W 135, *Streptococcus agalactiae* sau *Haemophilus influenzae* tip b.

Este foarte importantă pentru pacienții cu meningite bacteriene pretratați cu antibiotice, la care rezultatul bacterioscopiei directe este negativ.

Cultura

Culturile bacteriene se dezvoltă de obicei în 24- 48 ore și rezultatul se comunică imediat ce se identifică tulpina bacteriană, precizându-se specia identificată (e.g.: "Prezent *Streptococcus pneumoniae*"). Micobacteriile cresc mai lent, după 2-3 săptămâni de incubare, rezultatul comunicându-se în momentul în care se obține cultura pozitivă („prezent *Mycobacterium* spp”).

Fungii se dezvoltă după 48 ore, culturile fiind urmărite 4 săptămâni. Se comunică rezultatul, precizându-se specia identificată (e.g.: "Prezent *Cryptococcus neoformans*" sau „Prezent *Candida* spp”).

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 16 din 17

Daca nu s-au izolat microorganisme după incubarea timp de 48 ore a mediilor solide sau timp de 5 zile a mediilor lichide, se comunică absenta microorganismelor ce pot fi izolate în LCR/alte lichide de puncție.

Antibiograma (antifungigrama)

Pentru ca diagnosticul și tratamentul meningitelor reprezintă o urgență, în meningitele bacteriene cu densitate bacteriană suficientă în proba de LCR (zeci de bacterii în medie pe câmp microscopic la examinarea cu imersie) se poate încerca antibiograma pe cultura primară ale cărei rezultate (comunicate la 24 ore) urmează a fi confirmate prin antibiograma pe subcultura standardizată. Pentru meningococii, streptococii și pneumococii izolați din LCR se va face și determinarea concentrației minime inhibitorii pentru penicilină și cefotaximă.

În meningitele fungice se face antifungigrama pe galerii API (Fungus 3), rezultatul comunicându-se la 24-48 ore după izolarea și identificarea fungului.

5.5. Activitati finale

Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de către operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de către șeful de laborator.

Raportarea

Comunicarea rezultatelor se face:

-în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant ; buletinul de analiză este semnat și parafat de către responsabilul de analiză și managerul tehnic.

-în baza de date a laboratorului și spitalului;

-rezultatele urgențelor se transmit telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITĂȚI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01

Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă.

6.2. Responsabilul de analiză

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern, cod F-PGL-5.4.-1A

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul 01, din registrul de lucru RGL-4.4.-03 A și din registrul de comenzi interne și respinse.

Examinează preparatele de microscopie optică și culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă și latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimice dezvoltate de bacterii și a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL LICHIDELOR DE PUNCȚIE COD: PSL-M1-01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 17 din 17

laborator și formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL-4.4-01-A. Întocmește și tipărește buletinul de analiză, cod F-PGL-5.8-01.

Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză, cod F-PGL-5.8-01 și îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia eprubetele cu lichide de puncție concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură și de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registru de lucru, cod RGL-4.4.-01-A. Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătită pentru utilizare, în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru însămânțare.

Efectuează însămânțarea produselor biologice pe medii de cultură, pregătește preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

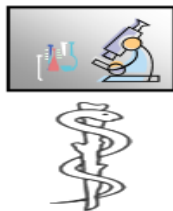
Transmite buletinul de analiză, cod analiza F-PGL-5.8-01 registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 A
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 A



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA SPECIFICĂ

HEMOCULTURA

COD PSL - M1 - 02

Editia 1, Revizia 0
Din data 01.05.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

Elaborat:
Conf. Univ. Dr. Olivia Dorneanu

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1
		Revizia 0 Exemplar nr. Pag. 2 din 9

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 3 din 9

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 4 din 9

CUPRINS

1. SCOPUL.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2. DOMENIUL DE APLICARE.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3. DOCUMENTE DE REFERINTA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4. DEFINITII SI ABREVIERI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1. DEFINITII.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.2. ABREVIERI.....	6
5. DESCRIEREA ACTIVITATII.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1. CONDIȚII PREALABILE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.2. RESURSE NECESARE	6
5.3. EXECUTIA ANALIZEI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.5.ACIVITATI FINALE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
6. RESPONSABILITATI	9
7. INREGISTRARI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
8. ANEXE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 5 din 9

1.SCOP

Prezenta procedura descrie o metoda calitativa pentru detectarea microorganismelor prezente in sânge.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedură este utilizată în cadrul Laboratorului de analize medicale al Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva" Iași, compartimentul de Microbiologie 1.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- 3.1. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL - 01
- 3.2. SR EN ISO 15189 :2007 - Cerinte particulare pentru calitate si competenta
- 3.3 SR ISO /TR 22869:2005 – Ghid pentru implementarea in laboratoare ISO 15189:2003
- 3.5. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- 3.6. SR EN ISO 9001 :2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- 3.7. Dumitru Buiuc, Marian Neguț. Tratat de Microbiologie Clinică. Ed. Medicală, București, 2008.

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definitii

Hemocultura este însămânțarea și incubarea într-un mediu de cultură adecvat a unei probe de sânge, în scopul izolării și identificării bacteriilor sau fungilor pe care îi conține. Sangele omului este normal steril iar sistemul circulator are importante capacitati de eliminare a microorganismelor.

Bacteriemia este prezenta in sange a bacteriilor provenite dintr-un focar septic sau de pe o mucoasa lezata. Frecvent este lipsita de expresie clinica.

Septicemia este o bacteriemie importanta cu evolutie clinica neregulata, imprevizibila si grava, acompaniata de frisoane, febra neregulata, toxemie, hipotensiune, prostratie, eruptii cutanate polimorfe si variate metastaze septice tisulare sau viscerale.Gravitetea sindromului septicemic lasa pe al doilea plan simptomatologia focarului infectios primar, care trebuie insa totdeauna cautat.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 6 din 9

Microrganismele izolate cu semnificatie clinica izolate din hemoculturi, in ordinea frecventei sunt: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp, *Proteus* spp, streptococi alfa si beta hemolitici, pneumococi, enterococi, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, anaerobi, *Salmonella* spp, stafilococi coagulazo-negativi, *Corynebacterium* spp., *Listeria monocitogenes*, *Leptospira*, *Brucella* spp, fungi.

4.2. Abrevieri

ATCC: American Type Culture Colection

UFC: unități formatoare de colonii

TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză, sare de fier)

MIU: mobilitate, indol, urează

SF: ser fiziologic

AD: apă distilată

BGN : bacili gram-negativi

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Condiții prealabile

Anterior prelucrării hemoculturii, se efectuează instruiți personalului, de protecție a muncii și securitate specifică analizei procedurale. Asistenta de la compartimentul Microbiologie 1 va purta echipament de protecție corespunzător și va prelucra hemocultura utilizând hota cu flux laminar din dotarea compartimentului.

5.2. Resurse necesare

5.2.1. Aparatură

- hotă cu flux de aer laminar (Lamil Plus 13)
- autoclav
- etuvă
- termostat (LEEC)
- frigider
- microscop (Optika B-350)
- lampă cu radiații ultraviolete
- bec de gaz Bunsen

5.2.2. Materiale și reactivi

- baloane/flacoane cu mediu bulion cord-creier turnat în laborator
- flacoane pentru hemocultură gata de utilizare
- cutii Petri cu medii turnate în laborator (agar-sânge, agar-chocolat, agar Sabouraud)
- medii de identificare turnate în tuburi (TSI, mediu cu manită și uree, Simmons, apă peptonată, mediu cu fenilalanină, mediu cu lizină, mediu cu bilă-esculină)

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 7 din 9

- reactiv pentru testul oxidazei
- apă oxigenată
- discuri de optochin, bacitracina
- galerii de identificare stafilococi, bacili gram-negativi, levuri
- hârtie pH
- lame de microscop
- baterie de colorație Gram
- soluție dezinfectantă
- pipete
- anse de însămânțare
- scală nefelometrică McFarland
- microcomprimate pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- tulpini de referință ATCC
- hârtie de filtru
- apă distilată
- pense
- eprubete
- ulei de cedru

5.3. Execuția analizei.

Recoltare și transport. Hemoculturile, recoltate la patul bolnavului conform Manualului de recoltare PGL-5.4-1, sunt transportate imediat la laborator, în condiții izoterme (minim 30°C), unde sunt imediat înregistrate.

În intervalul orar în care laboratorul de microbiologie nu are activitate, hemoculturile etichetate corespunzător sunt incubate în termostatul de gardă al laboratorului.

Etichetare. Probele ajunse în laborator sunt preluate din camera de recepție de către asistenta de compartiment. Probele sunt verificate din punct de vedere al calitatii și a datelor de identificare și sunt înregistrate în registrul de comenzi interne și primesc un număr curent de registru regăsit pe culturi.

Incubare. În laborator hemoculturile sunt incubate la 37°C, incubat aerob și/sau anaerob. Incubarea în atmosferă de 5-10% CO₂ este obligatorie pentru izolarea brucelelor. Hemoculturile sunt urmărite 7 zile, cu examinare macroscopică, microscopică și prin subcultivare. La pacienții cu endocardită infecțioasă, la cei aflați sub antibioticoterapie, pentru microroganismele cu exigențe particulare, prelungim perioada de incubare la 14 zile.

Examenul macroscopic se face de 2 ori pe zi în primele 3 zile și apoi zilnic, cu aprecierea semnelor creșterii:

- pe stratul de hematii examinat în lumină reflectată, prezența coloniilor sau a unui depozit floconos;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 8 din 9

- tulburare uniformă sau numai la suprafața mediului, peliculă uneori la examinarea supernatantului prin transparență;
- hemoliza;
- coagularea mediului;
- prezența bulelor de gaz.

Microscopia. Efectuăm și colorăm Gram frotiuri din flacoanele de hemocultură, prin manipularea strict aseptică a acestora. Examinăm frotiurile la microscopul cu imersie și comunicăm imediat clinicianului eventualele rezultate de etapă pozitive.

Subcultivarea. Dacă hemocultura este *fără creștere evidentă*: epuizăm zilnic câte o ansă pe o placă cu agar-chocolat ce va fi incubată în aerobioză și agar-sânge pentru anaerobi. Dacă hemocultura rămâne negativă până la sfârșitul perioadei de observație, din hemocultura agitată însămânțăm câteva picături într-un tub cu bulion tioglicolat pe care îl urmărim 3 zile la 37°C.

Dacă hemocultura este *cu creștere evidentă*, funcție de flaconul în care este prezentă creșterea, etalăm câte o ansă pe mediile de cultură precizate mai sus. Efectuăm frotiu colorat Gram. Bacterioscopia precizează:

- oportunitatea testelor de identificare în cultură primară (e.g., pentru diplococi sau streptococi: sensibilitate ala optochin, bacitracină; pentru stafilococi diferențierea *Staphylococcus aureus* de stafilococii coagulazo-negativi; bacili gram-negativi: oxidaza, triajul biochimic pe mediile TSI, MIU, citrat Simmons);
- efectuarea antibiogramei directe, nestrandardizate, utilizând drept inocul hemocultura. Aceste rezultate sunt ulterior confirmate prin antibiograma din subcultură standardizată.

Identificarea si antibiograma.

Pentru izolatele cu semnificație clinică se continuă investigația prin identificare (vezi Identificarea bacteriilor) și prin testarea sensibilității la antibiotice (vezi Antibiograma difuzimetrică).

Controlul intern de calitate. Se efectueaza controlul intern de calitate al mediilor turnate, al antibiogramei difuzimetrice, al metodelor de identificare .

5.4. Prezentarea rezultatelor.

Rezultatul de etapă poate fi precizat după examenul frotiului din hemocultura pozitivă colorat Gram. Se precizează categoria microscopică a bacteriei observate și numărul de hemoculturi în care este ea prezentă la un anume pacient.

Rezultatul final se comunică după identificarea bacteriei izolate și testarea sensibilității ei la antibiotice. Interpretarea semnificației clinice a bacteriei izolate este făcută de către clinician având în vedere argumentele microbiologului (număr de hemoculturi pozitive, număr de flacoane pozitive etc) și argumentele clinicianului.

Rezultat pozitiv : Prezent, urmează numele speciei identificate.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ HEMOCULTURA COD PSL - M1 - 02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 9 din 9

Rezultat negativ : Absenți după 7 zile de incubare : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp, *Proteus* spp, streptococi alfa si beta hemolitici, pneumococi, enterococi, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, anaerobi, *Salmonella* spp, stafilococi coagulazo-negativi, *Corynebacterium* spp., *Listeria monocitogenes*, fungi

5.5. Activități finale.

După prelucrarea hemoculturii, se închide hota, se decontaminează suprafețele de lucru, se pune în funcțiune lampa cu ultraviolete. Hemocultura se reincubează în termostat, la 37°C.

După prelucrarea subculturilor se închid și depozitează în frigider kiturile de latex aglutinare utilizate, microcomprimătele cu substanțe antimicrobiene.

După examinarea frotiurilor se închide microscopul și se efectuează mentenanța la sfârșitul zilei lucrătoare.

6. RESPONSABILITATI

Medicul responsabil de analiză:

- citește și interpretează rezultatele
- efectuează controlul intern și extern de calitate
- validează rezultatul prin semnatura și parafă

Asistentul de laborator:

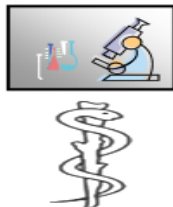
- Înregistrează proba în registrul de evidență a analizei
- Verifică funcționarea mijloacelor de încercare și / sau măsurare
- Pregătește probele pentru a fi citite de către responsabilul de analiză conform procedurii specifice
- Comunica orice problemă intervenită în timpul prelucrării probelor
- Înregistrează rezultatele

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 B
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 B



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA SPECIFICĂ

**ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A EXSUDATULUI
FARINGIAN/ NAZAL**

COD: PSL – M1 – 03

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt în exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 14

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 3 din 14

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 14

CUPRINS

1. SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
 - 5.1. CONDIȚII PREALABILE
 - 5.2. RESURSE NECESARE
 - 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
 - 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
 - 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 14

1. SCOPUL

Procedura descrie activitățile și etapele privind prelucrarea exsudatului faringian și nazal în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în angine și a depistării portajului faringian și nazal de *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus*.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- Manualul calitatii
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Manualul de recoltare a probelor biologice
- D. Buiuc, Microbiologie medicală- Ghid pentru studiul și practica medicinei, Ed.Gr T Popa Iasi, 2003
- D. Buiuc, M. Neguț, Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală, București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele truselor de reactivi

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definitii

Exsudat faringian: produs biologic/patologic recoltat de la nivelul faringelui (văl palatin, amigdale, pilieri).

Exsudat nazal: produs biologic/patologic recoltat de la nivelul mucoasei nazale.

Semnificație clinică - exsudat faringian

Examenul microbiologic al exsudatului faringian se efectuează pentru:

- diagnosticul faringitelor și anginelor streptococice;
- depistarea portajului de *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus*;
- diagnosticul anginelor fungice.

Streptococcus pyogenes este responsabil de majoritatea anginelor bacteriene, cărora le imprimă gravitate prin complicații infecțioase (sinuzite, otite, mastoidite,

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 14

adenite cervicale supurate, flegmon amigdalian) sau postinfecțioase (reumatism poliarticular acut, miocardita acuta, glomerulonefrita acuta, coree). Scarlatina apare în cursul infecției streptococice, cel mai frecvent faringiană, rar a unei plăgi, cu tulpini eritrotoxigene la persoane care nu posedă antieritrotoxină.

Streptococii de grup C su G sau *Arcanobacterium haemolyticum* sunt ocazional cauza unor faringite.

Infecții secundare ale orofaringelui si cavității bucale sunt determinate de comensali conditionat patogeni (angina si stomatita fuso-spirochetoza Vincent, candidoza) când rezistența antiinfecțioasă este scăzută.

Semnificație clinică - exsudat nazal

Examenul bacteriologic al exsudatului nazal este indicat pentru depistarea portajului de *Staphylococcus aureus* (spre exemplu, in izbucniri epidemice de infecție nosocomiala stafilococica) și *Streptococcus pyogenes*.

4.2. Abrevieri

AS: agar Columbia cu 5% sange de berbec;

LA: latexaglutinare

MC: mediul Mac Conkey

Sab C: mediul Sabouraud cu cloramfenicol

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Conditii prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecție si va respecta normele de protecția muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregatită pentru utilizare de către asistentul de laborator .

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider;
- lampa UV
- microscop optic

Resurse

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 7 din 14

- anse;
- lame microscop;
- ulei de cedru;
- bec de gaz Bunsen;
- baie colorare;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
- pense;
- pipete automate;
- pipete sterile;
- varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
- lame/lamele;
- eprubete sterile de 10/10;
- stative eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar Columbia cu 5% sânge de berbec, agar Columbia cu 5% sânge și 3,5% clorura de sodiu, agar Sabouraud cu cloramfenicol, agar Mac Conkey;
- materiale de control, tulpini de referință;
- discuri pentru antibiogramă și pentru testul la bacitracina;
- trusa de identificare grup streptococi;
- trusa de identificare *Staphylococcus aureus*;
- trusa de coloratie Gram si albastru de metilen;
- ser fiziologic;
- perhidrol;
- solutii dezinfectante.

Mediile de cultură sunt preparate in laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime strat turnat in placă, pH-ul mediului, sterilitatea, etc).

5.3. Continutul procedurii

Proba este reprezentata de tamponul cu exsudatul faringian sau exsudatul nazal prelevat.

Principiul biologic care sta la baza examinării exsudatului faringian si a exsudatului nazal constă in recoltarea, cultivarea, izolarea, identificarea agentului patogen și determinarea sensibilității la antibiotice. Examenul uzual al exsudatului faringian vizează depistarea si identificarea streptococilor beta-hemolitici. Cultivarea pentru alte bacterii se face numai la cerere expresă, pentru că necesită alte medii de cultura.

5.3.1. Recoltarea

Recoltarea și transportul la laborator se efectuează conform instrucțiunilor descrise in „Manualul de recoltare a produselor biologice”.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 14

5.3.2. Transportul

Transportul probelor la laborator se face în maxim 3 ore de la prelevare. Dacă acest interval nu poate fi respectat, se impune transportul tamponului în bulion de conservare-îmbogățire (Todd-Hewitt cu azid de sodiu și cristal violet), astfel putând fi păstrate 24 ore.

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Asistentul care deservește compartimentul de microbiologie 1 preia tampoanele cu exsudate faringiene/nazale și formularele de solicitare analize de la registratorul medical, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notând date de identificare pacient, analiza și numele operatorului.

Etapele examenului microbiologic sunt:

5.3.3.1. Examenul microscopic direct al frotiului (efectuat prin descărcarea tamponului pe o lamă de microscop) colorat Gram este indicat doar în suspiciunea anginei Vincent sau a celei fungice.

Se urmărește:

- prezența în cantitate mare de levuri, în special sub formă de pseudohife în candidoza faringiană;
- prezența a numeroși bacili fusiformi gram negativi și spirochete asociați reacției inflamatorii în angina Vincent.

Rezultatul poate fi comunicat imediat.

5.3.3.2. Cultivarea

Medii de cultură folosite:

- AS - agar Columbia cu 5% sânge de berbec sau
- Mediul selectiv AS cu 3,5% clorură de sodiu (inhibă flora de asociație, mai ales streptococii orali, favorizând izolarea streptococilor beta hemolitici de grup A, B, C sau G).
- Mediul Sabouraud cu cloramfenicol se utilizează când este recomandată izolarea fungilor din exsudatul faringian;
- Mediul Mac Conkey este utilizat dacă se solicită depistarea portajului de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp sau *Acinetobacter* spp;
- agar Muller Hinton sânge.

Tamponul se descarcă prin rulare pe un sector al unei plăci cu AS, apoi se dispersează inoculul cu ansa în celelalte trei sectoare. Prin înțepare sau scurtă secționare a mediului cu ansa la sfârșitul epuizării în fiecare cadran se creează condiții microaerofile care protejează de oxidare streptolizina O și permit depistarea tulpinilor de *Streptococcus pyogenes* neproducătoare de streptolizina S.

Se pot descărca două tampoane pe câte o jumătate de placă Petri sau chiar trei, dacă se folosește mediu selectiv AS cu 3,5 % clorură de sodiu.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 14

Dacă este recomandat, tamponul se descarcă și pe ½ placă cu agar Sabouraud cu cloramfenicol (pentru a izola *Candida* spp) și pe ½ placă cu agar Mac Conkey (pentru a izola bacili gram negativi).

Incubarea plăcilor cu AS se realizează aerob la 37°C timp de 18-24 ore, prelungindu-se până la 48 ore la temperatura camerei dacă la prima citire lipsesc coloniile beta hemolitice caracteristice.

Placa cu mediul Sabouraud cu cloramfenicol se incubează 18-24 ore la 37°C, apoi la temperatura camerei 7 zile.

Citirea culturilor

Se examinează plăcile cu AS în lumină transmisă și reflectată, urmărind prezența și numărul coloniilor mici (0,5-1mm diametru), transparente sau opace, înconjurate de o zonă largă de beta hemoliză, specifice streptococilor beta hemolitici și coloniile mari, cremoase, beta hemolitice, caracteristice stafilococului auriu.

Pe plăcile cu mediu Sabouraud se urmăresc coloniile mari, cu diametrul de 2-5 mm, cremoase, albe, cu miros de drojdie.

Incubarea se prelungește prin păstrarea plăcilor la temperatura camerei încă 24 ore pentru streptococi și stafilococi și 7 zile pentru fungi.

5.3.3.3. Identificarea izolatelor se face prin:

- frotiu colorat Gram
- testul catalazei diferențiază streptococii de stafilococi (streptococii sunt catalazo negativi)
- testul de sensibilitate la bacitracină diferențiază streptococii beta hemolitici de grup A de cei non grup A
- identificarea antigenică a grupului streptococic prin reacția de latexaglutinare
- testul coagulazei pentru stafilococi identifică *Staphylococcus aureus*
- testul de filamentare pentru levuri pentru identificarea *Candida albicans*

a. Identificarea streptococilor beta hemolitici

Caractere microscopice

Streptococii sunt coci gram pozitivi dispusi in perechi sau in lanțuri scurte.

Caractere de cultură

Pe AS, după 18 ore de incubare aerobă la 37 grade, streptococii de grup A, C sau G formează colonii mici (0,5-1 mm diametru), transparente sau opace, înconjurate de o zonă largă de beta-hemoliză. Suprafața coloniilor poate fi neregulat mamelonată (colonii matt), lucioasă și cu relief acuminat (colonii glossy) sau mucoidă. În absența coloniilor beta-hemolitice, urmărim cu atenție hemoliza din jurul punctelor de înțepare a mediului. Dacă la acest nivel observăm beta hemoliza, se repică colonia din profunzimea înțepăturii cu incubare anaerobă a subculturii.

Testul catalazei

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 10 din 14

Pe o lama se pune o picătură din soluția 20% de peroxid de hidrogen si cu o mică baghetă din lemn se suspensionează o colonie din cultura organismului de testat. Se urmărește 30 secunde apariția bulelor de gaz.

Test pozitiv: apariția bulelor de gaz până la efervescentă.

Test negativ: absența bulelor.

Streptococii dau testul catalazei negativ.

Testul de sensibilitate la bacitracină

Se prelevă cu ansa o colonie de streptococ beta hemolitic si se însămânțează confluent un sector (1/4) din placa cu AS, efectuând striuri strânse și suprapuse in 3 direcții. În centrul ariei însămânșate se plasează un disc cu 0,04 U sau 0,1 U bacitracină. Se incubează 18 ore la 37 °C.

Test pozitiv: Orice zonă de inhibiție în jurul discului cu 0,04 U bacitracină sau un diametru >11 mm in jurul discului cu 0.1 U bacitracină.

Test negativ: Absența zonei de inhibiție la 0,04 U bacitracină, respectiv inhibiție cu diametrul mai mic de 11 mm in jurul discului cu 0,1 U bacitracină.

Diferențierea streptococilor beta-hemolitici se face prezumtiv prin testul la bacitracină în: streptococi de grup A (sensibili in proportie de 99%) si non-grup A (rezistenti in proportie de 97%).

Reacția de latexaglutinare

Identificarea antigenică a grupului Lancefield se realizează cu trusa de latex aglutinare si permite identificarea streptococilor beta-hemolitici non grup A (grup C sau G).

b. Identificare *Staphylococcus aureus*

Caractere microscopice

Pe frotiul colorat Gram efectuat din culturi pe mediu solid, stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuși in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

Caractere de cultură

Obișnuit, coloniile de *S. aureus*, după incubare 18 ore la 37 °C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafața netedă, bombată si lucioasă. Pe AS cu 5% sânge de berbec coloniile au o zona circulară de hemoliză în jur. Prezența pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristica a tulpinilor de *S. aureus*, dar si a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus*, *S. hominis*). Pigmentogeneza necesită prezența oxigenului și este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

Testul catalazei

Stafilococii dau testul catalazei pozitiv: prin suspensionarea culturii de stafilococ într-o picătură din soluția 20% de peroxid de hidrogen pe o lamă de sticlă, apar bule de gaz.

Testul coagulazei

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 11 din 14

Identificarea rapidă a speciei se face cu ajutorul reactivilor comerciali de aglutinare. Reactivii sensibilizați cu fibrinogen si IgG cuplează coagulaza legata respectiv proteina A din peretele *S. aureus*, ducând la aglutinarea amestecului dintre reactiv și cultura de *S. Aureus*.

c.

Identificare *Enterobacteriaceae*

Caractere microscopice: bacili gram negativi

Caractere de cultură: Fiind nepretențioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S” de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafața netedă și margini regulate sau colonii „R”, rotunde, plate, cu suprafața rugoasă și margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S” tulbură uniform mediul, iar formele „R” tulbură mediul în grade diferite, cu inel și depozit.

Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei și producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate și producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilaza, citrat dehidrogenaza și fenilalanildezaminaza. Se poate face și identificarea automată pe galerii API.

d. Identificare *Candida albicans*

Examen microscopic

Se efectuează un frotiu colorat gram din exsudatul faringian (prelevat din depozitul pseudo-membranos al leziunilor). Are valoare diagnostică prezența în cantitate enormă de levuri, mai ales sub forma de pseudohife.

Caractere de cultură

Cultivarea se face pe un sector de placă Sabouraud cu cloramfenicol și se incubează 18-24 ore la 37 °C, apoi se lasă la temperatura camerei 48-72 ore. Se urmărește prezența coloniilor mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.

Testul de filamentare

Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conține 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, se efectuează un preparat lamă-lamelă din suspensia obținută și se urmărește la microscop apariția filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

5.3.3.4. Antibiotograma

Streptococii beta hemolitici și-au păstrat nealterată marea sensibilitate la penicilină, dar au dobândit rezistență la alte antibiotice indicate în terapia anginelor (la eritromicină). Antibiotograma se efectuează numai la cerere expresă (e.g., la pacienții sensibilizați la peniciline). Antibiotograma poate fi făcută pentru supravegherea epidemiologică a rezistenței la aceste antibiotice, dar rezultatele rămân de uz intern.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 12 din 14

Controlul de calitate

Materialele (mediile de cultură, reactivii si coloranții) utilizate la prelucrarea exsudatului faringian si nazal sunt verificate cu tulpini de referință existente in laborator: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Aceste controale se efectuează la fiecare lot de mediu achiziționat sau turnat in laborator.

Echipamentele sunt verificate (tehnice si metrologice) după un program prestabilit.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Pentru identificarea microorganismului patogen se face corelarea caracterelor microscopice, de cultură, biochimice si antigenice.

Comunicarea rezultatelor

Se realizeaza prin întocmirea buletinului de analiză care cuprinde rezultatele examenului microscopic, a culturii si antibiogrammei, daca a fost solicitată.

Examenul microscopic

Se efectuează numai in suspiciunea de:

a. Angina Vincent: prezența pe frotiul colorat gram a numeroși bacili fusiformi gram negativi si spirochete in contextul unei reacții inflamatorii.

b. Candidoza orofaringiană: prezența pe frotiul gram a numeroase levuri si pseudohife miceliene.

Rezultatul poate fi comunicat imediat.

Cultura exsudat faringian

Se raportează rezultatul prin prezența sau absența următoarelor microorganisme:

- Streptococ beta hemolitic (grup A, C sau G);
- *Staphylococcus aureus* este raportat ca fiind prezent/absent doar la cererea expresă a clinicianului sau în cazul în care pacientul are streptococ beta hemolitic prezent.
- *Candida* spp (daca s-a solicitat);
- *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp sau *Acinetobacter* spp (daca s-a solicitat portajul)

Se precizează: "prezent streptococ beta-hemolitic prezumtiv de grup A sau non grup A", dacă identificarea s-a bazat numai pe testul de sensibilitate la bacitracină; se indică grupul antigenic, daca identificarea a fost definitivă. Se poate nota si evaluarea semicantitativă a creșterii, prezența a mai puțin de 20 colonii pe placă semnificând portaj (e.g. angina virală sau cu altă etiologie la un purtător sănătos de streptococ beta hemolitic).

Izolarea predominantă și în cantitate mare de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* sau alte *Enterobacteriaceae* ori *Pseudomonas aeruginosa* reflectă disbioza orofaringiana a unor pacienți și nu are neapărat semnificație clinică. Sunt comunicate numai la cerere expresă.

Pentru candidoza orofaringiană, valoare diagnostica are numai izolarea predominantă și în cantitate mare de *Candida albicans*, rar *C. tropicalis*, în concordanță

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 13 din 14

cu rezultatele microscopiei. Izolarea unei specii de *Candida* fără confirmarea frotiului direct este nesemnificativă.

Arcanobacterium haemolyticum. Pe o placă cu AS cu 3,5% NaCl se urmăresc coloniile mici (0,75 mm diametru), rotunde, ușor reliefate, discret hemolitice. Identificarea preliminară accesibilă laboratorului nostru cuprinde:

- examen microscopic al coloniilor pe frotiu colorat Gram: bacili gram pozitivi, ocazional așezați în “V”, lipsiți de granule metacromatice;
- testul catalazei negativ.

Cultura exsudat nazal

Se raportează rezultatul prin prezența/absența de:

- Streptococ beta hemolitic de grup A,C sau G;
- Staphylococcus aureus*.
- *Candida* spp (daca s-a solicitat);
- *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp sau *Acinetobacter* spp (daca s-a solicitat portajul)

Rezultatul se comunica scris în 24-72 ore; la solicitarea medicului, poate fi raportat și telefonic.

Antibiograma se comunica numai la cerere expresă.

5.5. Activități finale

5.5.1. Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre șeful de laborator.

5.5.2. Raportarea rezultatelor

Comunicarea rezultatelor se face:

- în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant sau pacientului; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză și managerul tehnic.
- în baza de date a laboratorului și spitalului;
- rezultatele urgențelor se pot transmite telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză, cod F-PGL-5.8-01.

Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANALIZA MICROBIOLOGICA A EXSUDATULUI FARINGIAN/ NAZAL COD: PSL – M1 - 03	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 14 din 14

6.2. Responsabilul de analiză

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern, cod F-PGL-5.4-1C.

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul 01, din registrul de lucru cod RGL -4.4-03 C și din registrul de comenzi interne-externe, cod RGL-4.4-01 I/E și registrul de comenzi respinse cod RGL-4.4-02.

Examinează preparatele de microscopie optică și culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă și latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimice dezvoltate de bacterii și a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator și formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL -4.4-03 C. Întocmește și tipărește buletinul de analiză, cod F-PGL-5.4-1C. Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia tampoanele cu exsudate concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură și de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru, cod RGL -4.4-03 C.

Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătită pentru utilizare, în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru însămânțare.

Efectuează însămânțarea produselor biologice pe medii de cultură, pregătește preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

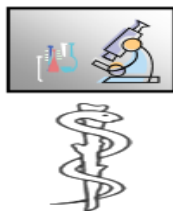
Transmite buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 C
- Buletinul de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 C



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

**PROCEDURA SPECIFICĂ
EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI**

COD PSL - M1 - 04

**Editia 1, Revizia 0
Din data 01.05.2013**

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

Elaborat:
Conf. Univ. Dr. Olivia Dorneanu

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 2 din 9

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 3 din 9

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 4 din 9

CUPRINS

1. SCOPUL.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2. DOMENIUL DE APLICARE.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3. DOCUMENTE DE REFERINTA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4. DEFINITII SI ABREVIERI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1. DEFINITII.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.2. ABREVIERI	6
5. DESCRIEREA ACTIVITATII.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1. CONDIȚII PREALABILE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.2. RESURSE NECESARE	6
5.3. EXECUTIA ANALIZEI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.5.ACIVITATI FINALE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
6. RESPONSABILITATI	9
7. INREGISTRARI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
8. ANEXE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 5 din 9

1.SCOP

Prezenta procedura descrie are ca scop determinarea cantitativa a bacteriuriei semnificative (folosind metoda ansei calibrate, respectiv urocultura cantitativă) si asocierea ei cu piuria. Principalele semne paraclinice ale ITU sunt: piuria (prezenta inflamatiei) si bacteriuria (agentul etiologic).

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta procedură este utilizată în cadrul Laboratorului de analize medicale al Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva" Iași, compartimentul de Microbiologie 1. Prezenta procedură este indicata in diagnosticul etiologic al ITU determinate de microorganisme condiționat patogene.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- 3.1. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL - 01
- 3.2. SR EN ISO 15189 :2007 - Cerinte particulare pentru calitate si competenta
- 3.3 SR ISO /TR 22869:2005 – Ghid pentru implementarea in laboratoare ISO 15189:2003
- 3.5. SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- 3.6. SR EN ISO 9001 :2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- 3.7. Dumitru Buiuc, Marian Neguț. Tratat de Microbiologie Clinică. Ed. Medicală, București, 2008.

4. DEFINITII SI ABREVIERI

4.1. Definitii

Urocultura: este o metode de lucru utilizata in laboratoare de microbiologie pentru analiza probelor de urina, constand in cultivarea si identificarea microorganismelor din urină. Metoda se practica ori de cate ori medicul clinician suspecteaza infectii ale tractului urinar.

Piurie: eliminarea leucocitelor in urina în cantitate de >10 leucocite/mmc.

Bacteriurie: eliminarea în urină a >10⁵ UFC/mL bacterii condiționat patogene aparținând aceleași specii.

4.2. Abrevieri

ITU : infecție a tractului urinar

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 6 din 9

ATCC: American Type Culture Colection

UFC: unități formatoare de colonii

TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză, sare de fier)

MIU: mobilitate, indol, urează

SF: ser fiziologic

AD: apă distilată

BGN : bacili gram-negativi

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Condiții prealabile

Anterior prelucrării probelor de urină, se efectuează instruirii ale personalului, de protecție a muncii și securitate specifică analizei procedurale. Asistenta de la compartimentul Microbiologie 1 va purta echipament de protecție corespunzător și va prelucra hemocultura utilizând hota cu flux laminar din dotarea compartimentului.

5.2. Resurse necesare

5.2.1. Aparatură

- hotă cu flux de aer laminar (Lamil Plus 13)
- autoclav
- etuvă
- termostat (LEEC)
- frigider
- microscop (Optika B-350)
- lampă cu radiații ultraviolete
- bec de gaz Bunsen

5.2.2. Materiale și reactivi

- cutii Petri cu medii turnate în laborator (agar-sânge, CLED, Uriselect agar Sabouraud, agar Mueller-Hinton)
- medii de identificare turnate în tuburi (TSI, mediu cu manită și uree, Simmons, apă peptonată, mediu cu fenilalanină, mediu cu lizină, mediu cu bilă-esculină)
- reactiv pentru testul oxidazei
- apă oxigenată
- galerii de identificare stafilococi, bacili gram-negativi, levuri
- hârtie pH
- lame de microscop
- baterie de colorație Gram
- soluție dezinfectantă
- pipete
- anse de însămânțare
- anse calibrate 10 µL

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase ”Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 7 din 9

- scală nefelometrică McFarland
- microcomprimate pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- tulpini de referință ATCC
- hârtie de filtru
- apă distilată
- pense
- eprubete
- ulei de cedru

5.3. Execuția analizei.

Recoltare, transport și conservare. Probele de urină pentru examen bacteriologic, recoltate în pavilion conform Manualului de recoltare PGL-5.4-1, sunt transportate la laborator în maxim o oră de la recoltare, unde sunt recepționate și înregistrate imediat. În intervalul orar în care laboratorul de microbiologie nu are activitate, probele de urină pentru examen bacteriologic etichetate corespunzător sunt conservate în frigiderul de probe al laboratorului.

Etichetare. Probele ajunse în laborator sunt preluate din camera de recepție de către asistenta de compartiment. Probele sunt verificate din punct de vedere al calitatii și a datelor de identificare și sunt înregistrate în registrul de comenzi interne și primesc un număr curent de registru regăsit pe froiuri și culturi.

Examen microscopic. Se omogenizează urina cu grijă, prin agitare. Se imeoersează imediat ansa sterilizată prin ardere la roșu și răcită sub nivelul fluidului și i se imprimă câteva mișcări pe verticală în sus și în jos. Se retrage ansa din fluid în poziție verticală și cu viteză moderată a mișcării. Se descarcă ansa pe o cameră de numărare Fuchs-Rosenthal. Se numără leucocitele pe 4 pătrate mari în diagonală, se înmulțește numărul cu 4 și se împarte la 3 pentru a obține numărul de leucocite per mmc urină. Eliminarea a până la 3 leucocite per mmc este normală. Se observă concomitent prezența celulelor epiteliale de descumare; peste 5 CES/câmp semnifică o probă contaminată.

O picatura din urina omogenizată se depune în centrul unei lame de microscop, fără etalare. După uscare și fixare se colorează Gram. Se urmărește prezența bacteriilor și se apreciază numărul lor per câmp microscopic examinat cu imersia. Prezența a 1-2 bacterii din aceeași categorie microscopică per câmp este asociată cu bacteriuria semnificativă.

Însămânțare.

a. Metoda ansei calibrate. Toate probele de urină sunt însămânțate prin epuizare cu ansa calibrată de 10 μ L pe câte un sfert de placă de agar-sânge/Uriselect.

b. Urocultura cantitativă. Din probele de urină cu piurie se face urocultură cantitativă. Se plasează 1 ml ser fiziologic steril într-un flacon de sticlă steril. Se adaugă 10 μ l

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 8 din 9

urină omogenizată, se amestecă viguros. Se extrag 100 µl urină astfel diluată și se plasează în centrul unei plăci Petri cu agar CLED. Se epuizează imediat inoculul pe toată suprafața plăcii. Dacă la examenul microscopic al frotiului colorat Gram din urina omogenizată se observa o categorie microscopica ce ar putea corespunde unei bacterii pretentioase nutritiv, se vor insamanta si mediile corespunzatoare.

Incubare. Se incubează plăcile la 35° - 37°C peste noapte.

Citirea culturilor. Se numără diferentiat, pe tipuri, coloniile dezvoltate.

Se calculează bacteriuria după formula:

a. Metoda ansei calibrate. $X = N \times 100$

b. Urocultura cantitativă. $X = N \times D \times 1/\text{vol. insamântat}$,

X = numărul de UFC/ml

N = numărul coloniilor de același fel pe sector, respectiv, pe placă;

D = factorul de diluție (inversul diluției = 100).

Citirea probelor.

Culturi negative

<1000UFC/ml

O singură specie este izolată între 10.000- 100.000 UFC/ml

Se comunică numărul acestora în UFC/ml și se precizează coci Gram pozitivi, bacili Gram negativi.

Se pot face identificarea la nivel de specie și testarea sensibilității la antibiotice, în prezența piuriei sau la cererea clinicianului. Se recomandă repetarea recoltei.

O singura specie predominant și în cantitate mare

Au semnificație clinică, în prezența piuriei:

>100.000 UFC/ml bacili gram-negativi (*Enterobacteriaceae*, BGN non-fermentativi)

>50.000 UFC/ml stafilococi (*S. aureus*, *S.saprophyticus*)

>10.000 UFC/ml levuri

Mai multe specii >100.000 UFC/ml

Prezența mai multor specii predominant și în cantitate mare este cel mai frecvent asociată cu contaminarea probei. Se recomandă repetarea recoltei. Un diagnostic microbiologic corect necesită informații clinice despre pacient oferite de către medicul curant.

Identificarea și antibiograma.

Pentru izolatele cu semnificație clinică (>100.000 UFC/ml, asociate piuriei) se continuă investigația prin identificare (vezi Identificarea bacteriilor) și prin testarea sensibilității la antibiotice (vezi Antibiograma difuzimetrică).

Controlul intern de calitate. Se efectuează controlul intern de calitate al mediilor turnate, al antibiogramei difuzimetrice, al metodelor de identificare .

5.4. Prezentarea rezultatelor.

Raportarea rezultatelor se face sub următoarea formă:

Negative: <1000UFC/ml

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL URINEI COD PSL - M1 - 04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag. 9 din 9

Absent: *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., BGN non-fermentativi, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., streptococi, levuri
Pozitive: >100.000 UFC/ml, identificarea microorganismului și antibiograma corespunzătoare.

5.5. Activități finale.

După prelucrarea urinei, se închide hota, se decontaminează suprafețele de lucru, se pune în funcțiune lampa cu ultraviolete. Proba de urină prelucrată se conservă în frigiderul de probe până la eliberarea rezultatului, apoi se aruncă în containerul dedicat, cu însemnele de pericol biologic.

După prelucrarea subculturilor se închid și depozitează în frigider kiturile de latex aglutinare utilizate, microcomprimatelor cu substanțe antimicrobiene.

După examinarea frotiurilor se închide microscopul și se efectuează mentenanța la sfârșitul zilei lucrătoare.

6. RESPONSABILITATI

Medicul responsabil de analiză:

- citește și interpretează rezultatele
- efectuează controlul intern și extern de calitate
- validează rezultatul prin semnatura și parafă

Asistentul de laborator:

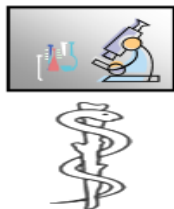
- Înregistrează proba în registrul de evidență a analizei
- Verifică funcționarea mijloacelor de încercare și / sau măsurare
- Pregătește probele pentru a fi citite de către responsabilul de analiză conform procedurii specifice
- Comunica orice problemă intervenită în timpul prelucrării probelor
- Înregistrează rezultatele

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 D
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 D



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

**PROCEDURA SPECIFICĂ
EXAMENUL
MICROBIOLOGIC AL SPUTEI**

COD: PSL – M1 – 05

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 2 din 12

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE DOCUMENTE

Denumirea documentului :

Locul difuzării	Primit				Retras		
	Nr. ex.	Data	Nume	Semn.	Data	Nume	Semn.
R. C	0.		As. Lorena Zaborila				
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânanu				
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu				

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase “Sf. Parascheva” Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 3 din 12

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Funcția și semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 4 din 12

CUPRINS

1. SCOP.....	5
2. DOMENIUL DE APLICARE.....	5
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ.....	5
3.1. MANUALUL CALITATII	5
3.2. SR EN ISO 15189 :2007	5
3.3 SR ISO /TR 22869:2005	5
3.4.SR EN ISO 15190 :2005	5
3.5 Manualul de recoltare a probelor biologice	5
3.6 - D.Buiuc, M.Neguț, Tratat de microbiologie clinica.....	5
3.7 D.Buiuc, Microbiologie medicală- Ghid pentru studiul și practica medicinei	5
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI.....	6
5. DESCRIEREA ACTIVITĂȚII.....	6
5.1 CONDIȚII PREALABILE.....	6
5.2 RESURSE NECESARE	6
5.3 EXECUȚIA ANALIZEI	7
5.3.1. Lista bacteriilor posibil izolate din infecțiile TRI:	7
5.3.2. Examenul macroscopic.....	8
5.3.3. Spălarea sputei.....	8
5.3.4. Microscopia.....	8
5.3.3. Cultivarea probei	9
5.4.Prezentarea rezultatelor	11
5.5. Activități finale.....	11
6. RESPONSABILITĂȚI	11
7. ÎNREGISTRĂRI.....	12
8. ANEXE.....	12

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 5 din 12

1. SCOP

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de organizare și desfășurare a etapelor determinării examenului microbiologic al sputei în conformitate cu cerințele impuse de normele de calitate în vigoare, în vederea demonstrării competenței laboratorului nostru.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul în cadrul Compartimentului de Microbiologie 01 al laboratorului **Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași**, de către personalul medical angajat și instruit în acest sens, pentru determinarea examenului microbiologic al sputei, de la prelevare până la eliminarea probelor și eliberarea buletinului de analiză.

3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ

3.1. MANUALUL CALITATII , Cod: MCL – 01, Ed. 1 Rev. 0

3.2. SR EN ISO 15189 :2007 - Cerinte particulare pentru calitate si competenta

3.3 SR ISO /TR 22869:2005 – Ghid pentru implementarea in laboratoare ISO 15189:2003

3.4.SR EN ISO 15190 :2005- Laboratoare medicale. Cerințe pentru securitate.

3.5 Manualul de recoltare a probelor biologice, cod MRP 01 , Ed.1, Rev.0

3.6 - D.Buiuc, M.Neguț, Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008

3.7 D.Buiuc, Microbiologie medicală- Ghid pentru studiul și practica medicinei, Ed.Gr T Popa Iasi 2003.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 6 din 12

4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI

PS = procedura specifică

PO = procedura operațională

PG = procedura generală

TRS = tractus respirator superior

TRI = tractus respirator inferior

SPUTA = Probă obținută de la pacienții cooperanți prin tuse spontană, profundă și supravegheată, după periajul dinților și clătirea energetică a gurii.

PMN: polimorfonucleare neutrofile

CI: celule inflamatorii

CES: celule epiteliale scuamoase

UFC: unități formatoare de colonii

BAAR: bacili acido-alcoolo-rezistenți

AS: mediu agar cu 5% sânge pentru cultivarea microorganismelor pretențioase și nepretențioase

M.H. - Mediu Müller-Hinton, cu valoare nutritivă, care permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăți de germeni și nu conține inhibitori ai acțiunii unor substanțe antimicrobiene.

SabC – Agar Sabouraud cu cloramfenicol, mediu agarizat selectiv pentru izolarea și studiul fungilor.

5. DESCRIEREA ACTIVITĂȚII

5.1 CONDIȚII PREALABILE

Anterior recoltării sputei, pacientul trebuie instruit astfel încât să înțeleagă diferența dintre a expectora și a scuipa. Dacă proba apare constituită în principal din salivă, cu aspect mucoïd spumos sau apos, trebuie insistat imediat pentru prelevarea unei noi probe corespunzătoare calitativ, care va fi transportată la laborator..

Anterior prelucrării sputei, se efectuează instruiți ale personalului de protecție a muncii și securitate specifică analizei procedurale. Asistenta de la compartimentul Microbiologie 1 va purta echipament de protecție corespunzător și va prelucra sputa utilizând hota cu flux laminar din dotarea laboratorului/compartimentului.

5.2 RESURSE NECESARE

Echipamente:

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider
- lampa UV

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 7 din 12

-microscop optic

Resurse:

- anse;
- lame microscop;
- ulei de cedru;
- bec de gaz Bunsen;
- baie colorare;
- cutii Petri;
- densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
- pense;
- pipete semiautomate;
- pipete sterile;
- vârfuri albastre și galbene pentru pipete semiautomate;
- cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
- lame/lamele;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi și alte substanțe:

- medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar Sabouraud cu cloramfenicol;
- materiale de control;
- discuri pentru antibiogramă;
- discuri de optochin;
- trusa de coloratie Gram și Ziehl-Neelsen;
- ser fiziologic;
- soluții dezinfectante;
- trusă de latex aglutinare pentru identificarea streptococilor beta-hemolitici;
- trusă de latex aglutinare pentru determinarea coagulazei;
- reactiv pentru oxidază;
- baterie de teste de identificare biochimică a bacteriilor;
- tulpini de referință.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime turnat în placă, pH-ul mediului, sterilitatea,etc).

5.3 EXECUȚIA ANALIZEI

5.3.1. Lista bacteriilor posibil izolate din infecțiile TRI:

- Streptococcus pneumoniae

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 8 din 12

- Haemophilus influenzae
- Staphylococcus aureus
- Moraxella catarrhalis
- bacili Gram negativi aerobi din familia Enterobacteriaceae
- bacili Gram negativi glucozo-nefermentativi
- fungi.

5.3.2. Examenul macroscopic

Sputa corespunzătoare calitativ recoltată conform procedurii din manualul de recoltare poate fi vâscoasă, purulentă de culoare galbenă, verzuie, ruginie sau cu urme de sânge.

Sputa necorespunzătoare va fi înregistrată în condica de probe respinse (cod RGL 4.4-02).

5.3.3. Spălarea sputei

Probele de spută mucopurulentă vor fi decontaminate prin spălare în 3 băi succesive de soluție salină izotonă (ser fiziologic). Spălarea dezagregă probele fluide, care nu trebuie examinate în continuare, fiind de calitate necorespunzătoare.

La prima spălare se toarnă peste probă, în recipientul de prelevare, o cantitate de ser fiziologic și se agită pentru separarea exsudatului bronhopulmonar de secrețiile oro-faringiene.

Apoi se repartizează în două plăci Petri cca 20 mL ser fiziologic. Se prelevă cu ansa porțiuni purulente din proba prespălată și se agită câte 15+20 de secunde în fiecare din următoarele băi de spălare.

5.3.4. Microscopia

Se absoarbe pe un dreptunghi de hârtie de filtru excesul de fluid de pe câte un fragment mucopurulent și se etalează pe 3 lame de microscop în strat cât mai subțire și uniform, evitând dilacerarea exsudatului prin mișcări de du-te-vino ale ansei. După uscare, frotiurile se fixează prin căldură și se colorează:

- primul Gram, pentru triajul citologic de calitate al probei și bacterioscopie;
- al doilea Ziehl-Neelsen, pentru urmărirea bacililor acido-alcool-rezistenți
- al treilea se păstrează necolorat, ca rezervă în caz de nevoie (coloratie defectuoasă, spargerea unei lame).

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 9 din 12

5.3.4.1. Examinarea frotiului colorat Gram

5.3.4.1.1. **Triajul citologic de calitate** al sputei se face cu putere de mărire 100x (obiectiv de 10x). În zonele bine etalate, cu celulele dispuse în monostrat, se determină pe 5-10 câmpuri numărul mediu al celulelor inflamatorii (CI) și al celulelor epiteliale scuamoase (CES) și prezența sau absența fibrinei. Pe această bază se efectuează scorul de calitate Q propus de Bartlett și colab. Conform tabelului 1.

Nr. celule per câmp microscopic la mărire 100x	Calificative pentru celule inflamatorii (CI)	Calificative pentru celule epiteliale scuamoase (CES)
0	0	0
1-9	0	0
10-24	+1	-1
≥25	+2	-2

Scorul Q este suma algebrică a calificativelor pentru CI și CES +1 pentru prezența fibrinei sau +0 în absența acesteia.

Sunt acceptate pentru bacterioscopie și sputocultură numai probele cu scorul Q de cel puțin +1.

5.3.4.1.2. **Bacterioscopia cantitativă.** Se selectează și examinează cu putere de mărire 1000x cât mai multe câmpuri bine etalate și corect diferențiate tinctorial, cu cel puțin 3 CI și la distanță de cel puțin 3 diametre, în orice direcție, de CES. Pe aceste câmpuri se determină numărul mediu de bacterii din aceeași categorie microscopică/câmp.

Asocierea cu PMN a cel puțin 10 bacterii din aceeași categorie microscopică are predicție pozitivă de peste 0,9 pentru izolarea în sputocultură a unui patogen din aceeași categorie microscopică în cantitate de cel puțin 100.000 UFC/mL (asociere semnificativă clinic).

5.3.4.2. Examinarea frotiului colorat Ziehl-Neelsen

Se examinează cu putere de mărire 1000x , câmp cu câmp (2-5 secunde pe câmp), evitând mișcarea continuă a lamei. Dacă pe primele 100 de câmpuri sunt depistați 1-3 bacili sau nu au fost observați deloc, se continuă examenul pe alte 100 de câmpuri. Artefacte acido-rezistente sunt ușor de confundat cu bacilii acido-alcoolo-rezistenți, de aceea observarea numai a câtorva bacili pe tot frotiul se consemnează ca suspiciune și se solicită examinarea unei noi probe.

5.3.3. Cultivarea probei

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 10 din 12

5.3.3.1. Medii utilizate: Proba de spută se cultivă pe o placă de agar sânge și jumătate de placă de SabC, din câte un fragment mucopurulent din care a fost eliminat excesul de lichid pe hârtia de filtru sterilă.

AS permite izolarea majorității bacteriilor implicate în etiologia infecțiilor de TRI, iar o strie de Staphylococcus aureus însămânțată peste ariile de epuizare a probei permite, prin fenomenul de satelitism, izolarea și identificarea în cultură primară a H. influenzae.

Utilizarea mediilor diferențiale lactozate este opțională, fiind utilă pentru urmărirea eventualelor bacili Gram negativi reperați microscopic.

Mediul SabC este utilizat pentru izolarea fungilor.

5.3.3.2. Izolarea semicantitativă: Se epuizează în 4 cadrane pe placa de AS o ansă din proba de spută spălată. Se însămânțează pe aceeași placă, perpendicular pe striurile sectoarelor 2-4 de epuizare, câte o strie de S. aureus. Opțional, în cazul depistării microscopice a pneumococilor se poate plasa în al doilea sector de epuizare a probei pe placa de AS a unui disc de optochin 4 µg.

5.3.3.3. Incubarea plăcii de AS se face în condiții de aerobioză cu 5% CO₂, peste noapte, la 37°C. Incubarea plăcii SabC se face peste noapte, la 30°C, iar cultura se urmărește până la 48 de ore la temperatura camerei.

A doua zi, se examinează culturile și se înregistrează semicantitativ izolatele pe tipuri de colonii.

Din expectorațiile care îndeplinesc exigențele citologice de calitate și sunt prelucrate conform specificațiilor, izolăm numai una-două bacterii cu creștere 3+ sau 4+ după epuizarea semicantitativă. În cazul probelor cu mai mult de 3 izolate în cantitate mare se sistează identificarea și nu se tentează antibiograma pentru că nu putem argumenta semnificația clinică în mod convingător.

5.3.3.4. Identificarea izolatelor se face conform procedurii operaționale de identificare a bacteriilor.

Streptococii α-hemolitici trebuie diferențiați în pneumococi, cu posibilă semnificație clinică, și streptococi viridans, fără semnificație clinică. Sensibilitatea la optochin (diametru ≥14 mm) identifică prezumtiv pneumococii.

Streptococii beta-hemolitici trebuie identificați prin latex-aglutinare.

Hemofilii sunt identificați până la nivel de specie pe baza caracterelor de cultură și a necesităților nutritive în factorii X și V.

Moraxella catarrhalis sunt identificate după caracterele de cultură (colonii alb-cenușii, friabile și intens oxidazopozitive), microscopice și asocierea lor microscopică cu Cl.

Enterobacteriaceele vor fi identificate utilizând bateria de teste biochimice, în circumstanțe clinico-epidemiologice sugestive și în cazul asocierii cito-bacteriologice cu asociere semnificativă cu Cl.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 11 din 12

Bacilii Gram negativi nefermentativi sunt identificați pe baza caracterelor microscopice, de cultură, biochimice și reacția oxidazei (pozitivă pentru P. aeruginosa, negativă pentru Acinetobacter spp.).

S. aureus se impune identificat, spre deosebire de stafilococii coagulzo-negativi, pe care îi înregistrăm fără a-i comunica. Identificarea se face pe baza caracterelor de cultură, microscopice și testul coagulazei pozitiv.

Fungii sunt raportați în cazul pacienților imunosupresați, cu asociere semnificativă microscopic.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Pe buletinul de analiză (cod FGL-5.8-01) se raportează:

- rezultatele microscopiei, scorul de calitate, asocierea semnificativă a unei categorii microscopice se bacterii cu CI, prezența sau absența BAAR
- Rezultatele culturii sunt comunicate cu genul și specia bacteriei crescute în cantitate mare, alături de rezultatele antibiogramelor citite și interpretate conform procedurii de efectuare a antibiogramelor.
- Opțional, putem face referire la semnificația clinică a tulpinii izolate și identificate.

5.5. Activități finale

După prelucrarea sputei, se închide hota, se decontaminează suprafețele de lucru, se pune în funcțiune lampa cu ultraviolete, se aruncă proba de spută prelucrată în containerul dedicat, cu însemnele de pericol biologic.

După prelucrarea secundară a culturilor se închid și depozitează în frigider kiturile de latex aglutinare utilizate, microcomprimătele cu substanțe antimicrobiene.

După examinarea frotiurilor se închide microscopul și se efectuează mentenanța la sfârșitul zilei lucrătoare.

6. RESPONSABILITĂȚI

6.1. MANAGERUL TEHNIC:

Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză. Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă.

6.2. RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul 01, din registrul de lucru cod RGL-4.4-03-E și din registrul de comenzi interne, cod RGL 4.4-

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva" Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 12 din 12

01 I registrul de comenzi externe cod, RGL 4.4-01 E și registrul de comenzi respinse cod RGL-4.4-02.

Examinează preparatele de microscopie optică și culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, interpretează caracterele exoenzimatic dezvoltate de bacterii și a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator și formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03-E.

Întocmește și tipărește buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01.

Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 și îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. ASISTENTUL DE LABORATOR

Preia urocultoarele în care a fost recoltată sputa concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de recepție.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03-E.

Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătită pentru utilizare în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru însămânțare.

Efectuează însămânțarea produselor biologice pe medii de cultură, pregătește preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

Execută repicările, aglutinările pe lamă și latex aglutinările solicitate de responsabilul de analiză.

Transmite buletinul de analiză, registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. ÎNREGISTRĂRI

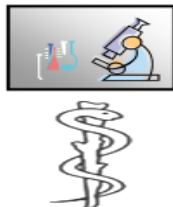
Se efectuează în timp real, în:

1. Registrul de comenzi interne/externe RGL 4.4-01 I/E
2. Registrul de lucru, cod RGL-4.4-03-E, atașat procedurii PSL-M1-05
3. Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02 (daca e cazul)
4. Buletin de analiza FGL-5.8-01.

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 E.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase “Sf. Parascheva” Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL SPUTEI COD PSL-M1-05	Ediția 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		Pag 13 din 12



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA SPECIFICA

**EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL
EXSUDATELOR GENITALE**

COD: PSL – M1 - 06

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt în exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 16

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 3 din 16

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 16

CUPRINS

1. SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
- 5.1. CONDIȚII PREALABILE
- 5.2. RESURSE NECESARE
- 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
- 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
- 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 16

Procedura descrie activitățile și etapele privind prelucrarea secrețiilor vaginale și uretrale în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în infecții ale tractului genital feminin și masculin.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele kit-urilor de reactivi
-

4.DEFINIȚII SI ABREVIERI

4.1.Definiții

4.1.A.Uretrita reprezintă inflamația mucoasei uretrale. Secreția uretrală – o scurgere uretrală mai abundentă sau mai discretă, continuă sau surprinsă mai frecvent înaintea micțiunii matinale, semn important al uretritei.

Sub raport etiologic, uretritele se clasifică în:

- Uretrite gonococice cu incubatie scurta de 4 zile, disurie marcată și scurgere uretrală uzual purulentă; netratate se cronicizează și dau complicații ca prostatite, epididimite, artrite.
- Uretrite nongonococice, cu incubatie de 7-14 zile și disurie mai puțin intensă, sunt determinate de: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* , virusul *Herpes simplex* sau bacili gram negativi.
- Uretrite postgonococice, frecvente în condiții de promiscuitate sexuală sunt determinate de o dublă infecție (cu gonococ și *C. trachomatis* sau *U. urealyticum*), de reinfecții gonococice sau de eșec terapeutic, prin infecția cu o tulpină de gonococ producătoare de beta lactamaze și multiplu rezistentă la antibiotice

4.1.B. Secreția vaginală reprezintă un transudat al mucoasei vaginale, ce conține celule epiteliale și flora microbiană care diferă în funcție de vârstă, stări fiziologice sau patologice: de la apariția menstruației și până la menopauză predomină lactobacilii, iar de la naștere până la pubertate și după menopauză flora vaginală e reprezentată de stafilococi, streptococi, difterimorfi.

Leucoree= scurgere vaginală abundentă, determinată de o inflamație difuză vulvo-

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 16

vaginală. Sub raport etiologic vaginitele se clasifică în :specifice (determinate de *Neisseria gonorrhoeaea*, *Trichomonas vaginalis* si *Candida albicans*) și nespecifice sau vaginoze.

Vaginozele reprezintă un sindrom infecțios neinflamator, caracterizat prin scurgeri alb-cenușii cu miros de pește alterat; apar prin înlocuirea florei lactobacilare normale cu o asociație dintre *Gardnerella vaginalis*, bacterii anaerobe și *Mycoplasma hominis*.

4.2. Abrevieri

AS: mediu agar cu 5 % sânge;
Ach: agar chocolate;
McC: agar Mac Conkey;
BCC: bulion cord creier;
SabC: mediul Sabouraud cu cloramfenicol;
PMN: polimorfonucleare neutrofile
H: hematii
L: leucocite
CES: celule epiteliale scuamoase
BGN: bacili gram negativi
BGP: bacili gram pozitivi
CGP: coci gram pozitivi

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiții prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecție si va respecta normele de protecția muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură, coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider;
- lampa UV
- microscop optic

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 7 din 16

Resurse

- anse;
- lame microscop;
- ulei de cedru;
- bec de gaz Bunsen;
- baie colorare;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
- pense;
- pipete automate;
- pipete sterile;
- varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
- lame/lamele;
- eprubete sterile de 10/10;
- stative eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar chocolate, agar MacConkey, agar Sabouraud;
- materiale de control, tulpini de referință;
- discuri pentru antibiogramă;
- trusa de colorare Gram, albastru de metilen și May- Grunwald- Giemsa;
- ser fiziologic;
- soluții dezinfectante;
- trusa de identificare grup streptococi;
- trusa de identificare *Staphylococcus aureus*
- medii de identificare a bacililor gram negativi (TSI, manita, indol, fenilalanin dezaminaza, citratdecarboxilaza)

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime turnat în placă, pH- ul mediului, sterilitatea, etc).

5.3. Conținutul procedurii

Proba este reprezentată de tamponul cu secreție uretrală/vaginală prelevat. Principiul biologic care stă la baza examinării secreției uretrale/vaginale constă în recoltarea și cultivarea produsului patologic, izolarea, identificarea agentului patogen și determinarea sensibilității la antibiotice.

5.3.1. Recoltarea

Recoltarea și transportul la laborator se efectuează conform instrucțiunilor descrise în PO- 06 „ Manualul de recoltare a produselor biologice”.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 16

5.3.1.A. Secreția uretrală se recoltează la cel puțin 2 ore după micțiune. Se prelevă pe tampon secreția uretrală spontană sau provocată prin expresia postero-anterioară a uretrei și comprimarea glandului. În suspiciunea infecției cu *Trichomonas vaginalis* recoltarea se face înaintea micțiunii matinale și tamponul se imersează într-un tub cu 1 ml soluție salină izotonă preîncălzită la 37 grade.

5.3.1.B. Secreția vaginală

Pentru *infecțiile genitale joase* recoltarea produselor patologice se efectuează în cabinetul de ginecologie, cu instrumentar adecvat, de obicei din fundul de sac vaginal posterior. Secreția vaginală se recoltează cu două tampoane : un tampon pentru frotiuri (3) care se prepară extemporaneu și unul pentru culturi. Dacă se presupune o infecție cu *Trichomonas vaginalis*, se recoltează al treilea tampon care va fi utilizat pentru efectuarea unui preparat umed lama-lamela.

În caz de bartolinite, la palparea glandei apare un exsudat purulent ce se va recolta pe două tampoane sterile.

La fetețe virgine cu leucoree, secreția se recoltează de la nivelul orificiului de deschidere a vaginului, recurgând la 3 tampoane pentru frotiuri si culturi.

5.3.2. Transportul

Transportul probelor la laborator se face uzual în maxim 2 ore de la prelevare, exceptând unele situații speciale. Secreția uretrală/vaginala trebuie trimisa imediat la laborator când există suspiciunea infectiei determinata de *Neisseria gonorrhoeae* sau *Trichomonas vaginalis*. Pentru *Chlamydia trachomatis* este recomandat transportul tamponului în 2 ml de mediu SPG (zaharoza- fosfat- glutamat) .

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Asistentul care deservește compartimentul de microbiologie 1 preia tampoanele cu secreție uretrala/vaginala și formularele de solicitare analize de la registratorul medical, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notand date de identificare pacient, analiza si numele operatorului.

În registrul de lucru se notează: numărul curent al probei, data, ID pacient, vârsta, diagnosticul, antibioterapia efectuată, denumirea analizei, metoda folosită, numele operatorului și numele celui care validează analiza.

Etapale examenului microbiologic sunt:

Prelevatul recoltat pe tampon este însămânțat prin descărcare și dispersie pe plăcile cu medii de cultură indicate pentru fiecare tip de produs, iar apoi tamponul se rulează pe trei lame de microscop curate și se efectuează frotiuri. Se colorează un frotiu cu albastru de metilen, unul gram, iar al treilea este de rezervă.

5.3.3.A. Prelucrarea secreției uretrale

Se pregătesc plăcile cu MC utilizate pentru însămânțare (se scot de la frigider, se usucă suprafața lor la termostat și se notează ID-ul probei pe plăci) și 2 lamele de microscop curate pentru efectuarea frotiurilor, notându-se cu creionul pe marginea lamei

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 16

ID-ul probei. Tamponul cu secreție uretrală este însămânțat prin descărcare și dispersie pe cate o placa cu AS, Ach, McC (și pe o placa cu SabC, daca se solicita). Pentru economie se poate folosi cate 1/2 placa din fiecare MC.

Din al doilea tampon se efectuează 3 frotiuri pe lame de microscop curate prin rotirea tamponului pe toate fețele. Frotiurile sunt uscate prin căldură și se colorează unul gram și unul cu albastru de metilen, celălalt fiind păstrat de rezervă.

Incubarea placilor se face 18- 24 ore la 35°C – 37°C, uzual aerobă, cu prelungirea incubării până la 48 ore, dacă la 24 ore nu s-au dezvoltat culturi. Placa cu mediul SabC este incubata 24 ore la 37° si apoi 7 zile la temperatura camerei.

Examenul microscopic

Uzual, diagnosticul de laborator trebuie să ateste prezența sau absența gonococului. Dacă proba a fost purulentă, examinarea poate începe direct cu imersia; în cazul probelor muco- purulente sau mucoide, sunt reperate insulele de celule inflamatorii cu obiectivul 10X și apoi se face examinarea cu imersia. Se observă celule inflamatorii, celule epiteliale scuamoase sau celule cuboide ale uroepiteliului. Prezența a mai mult de 1 PMN/ câmp examinat cu imersia se corelează cu uretrita acută. La pacienții cu iritație uretrală depistarea unei reacții inflamatorii minime sugerează infecția. În prelevatele din uretra distală prezența extracelulară a florei mixte (gram pozitivă, gram negativă) este normală. Prezența diplococilor gram negativi dispuși în „boabe de cafea”, intra- și extracelular sugerează diagnosticul de uretrită gonococică.

Dacă se constată prezența reacției inflamatorii, dar bacterioscopia este negativă, frotiul de rezervă se colorează Giemsa și se examinează pentru depistarea protozoarului *Trichomonas vaginalis*. *T. vaginalis* determină 5 % din uretrite la bărbat și apare pe frotiul colorat Giemsa piriform, cu nucleul situat la polul anterior, având mărimea unui macrofag. Prezența levurilor pe câmpuri repetate semnifică etiologia candidozică a uretritei, în timp ce depistarea câtorva levuri pe întreg frotiul nu are semnificație clinică.

Citirea culturilor Citirea plăcilor se realizează după 24-48 ore și se urmărește dezvoltarea culturilor de microorganisme implicate în etiologia uretritelor nespecifice: *Staphylococcus aureus* pe AS, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* și *Pseudomonas aeruginosa* pe AS și McC, *Candida* spp pe mediul SabC.

Identificarea

Identificarea izolatelor se face prin : examen microscopic, caractere de cultură, caractere biochimice și identificare antigenică.

Pentru identificare se efectuează frotiu din cultură și se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la gonococi și *Pseudomonas aeruginosa*) , testul coagulazei (pentru stafilococi) , mediile TSI, manita cu uree, reacția indolului, citrat Simmons pentru *Enterobacteriaceae*, test de filamentare pentru levuri.

Neisseria gonorrhoeae

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 10 din 16

- Examen microscopic: diplococi gram negativi, cu diametrul de 0,6-1 mm, fețele adiacente reniforme sau aplatizate (în boabe de cafea);
- Caractere de cultură: pe Ach ,dupa 24-48 ore incubare în atmosferă de CO₂ la 37° C, formează colonii S transparente, de 1-2 mm diametru, rotunde, cu margini regulate, netede, lucioase;
- Caractere biochimice: testul oxidazei pozitiv.

Staphylococcus aureus

- Examen microscopic: stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuși in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.
- Caractere de cultură: Obișnuit, coloniile de *S. aureus*, după incubare 18 ore la 37 °C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafața netedă, bombată si lucioasă. Pe AS cu 5% sânge de berbec coloniile au o zona circulară de hemoliză în jur. Prezența pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristica a tulpinilor de *S. aureus*, dar si a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus*, *S. hominis*). Pigmentogeneza necesită prezența oxigenului și este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.
- Testul catalazei:Stafilococii dau testul catalazei pozitiv
- Testul coagulazei: pozitiv

Streptococcus agalactiae

- Examen microscopic: streptococii sunt coci gram pozitivi dispusi in perechi sau in lanțuri scurte.
- Caractere de cultură
Pe AS, dupa 18 ore de incubare aerobă la 37 grade, streptococii de grup B formează colonii înconjurate de o zonă beta-hemoliză incompleta.
- Testul catalazei: negativ.
- Reacția de latexaglutinare: identificarea antigenică a grupului Lancefield se realizează cu trusa de latex aglutinare si permite identificarea streptococilor beta-hemolitici de grup B.

Enterobacteriaceae

- Examen microscopic: bacili gram negativi
- Caractere de cultură: Fiind nepretențioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S” de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafața netedă și margini regulate sau colonii „R” , rotunde, plate, cu suprafața rugoasă și margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S” tulbură uniform mediul, iar formele”R” tulbură mediul în grade diferite, cu inel si depozit.
- Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei si producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate și producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilază, citrat dehidrogenază si fenilalanildezaminază. Se poate face si identificarea automată pe galerii API.

Pseudomonas aeruginosa

- Examen microscopic: bacili gram negativi fini

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 11 din 16

- Caractere de cultură: Cultivă pe toate mediile de cultură, la 5-42° C, optim la 37°C, formand colonii mari, cu luciu metalic, pigmentate în galben-verde sau galben-brun, hemolitice pe AS, ce degajă o aromă asemănătoare florilor de iasomie
- Caractere biochimice: catalaza pozitivă, oxidaza pozitivă, nonfermentativi.

Candida albicans

- Examen microscopic: celule ovale, gram pozitive, unele inmugurite
- Caractere de cultură: pe mediul Sabouraud formează colonii mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.
- Testul de filamentare: Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conține 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, efectuează un preparat lamă- lamelă din suspensia obținută și se urmărește la microscop apariția filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

Interpretarea rezultatelor

Este normală prezența extracelulară a florei mixte, gram pozitive, gram negative și a câtorva celule levurice în prelevatele din secreția uretrală distală. Izolarea de stafilococi coagulazo-negativi, streptococi alfa-hemolitici și bacili gram negativi în cantitate redusă nu are semnificație clinică.

În uretrita specifică gonoreică, în faza incipientă apar numeroase leucocite (PMN) și numeroși diplococi gram negativi, intra- și extracelulari. În faza de vindecare scade numărul leucocitelor și a gonococilor, cu apariția celulelor epiteliale și a florei bacteriene secundare.

În uretritele nespecifice pot fi izolați: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Candida albicans*, semnificația acestora fiind stabilită prin corelarea cu examenul microscopic.

Antibiograma

Se realizează pentru izolatele cu semnificație clinică prin metoda difuzimetrică descrisă în procedura „Antibiograma”.

5.3.3.B. Prelucrarea secreției vaginale

Se pregătesc plăcile cu MC utilizate pentru însămânțare (se scot de la frigider, se usucă suprafața lor la termostat și se notează ID-ul probei pe plăci) și 2 lamele de microscop curate pentru efectuarea frotiurilor, notându-se cu creionul pe marginea lamei ID-ul probei.

Tamponul pe care s-a prelevat secreția vaginală și frotiurile se trimit rapid la laborator, urmând a fi prelucrate.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 12 din 16

Frotiurile se colorează :unul cu albastru de metilen sau Giemsa, al doilea se colorează, iar ultimul rămâne de rezervă.

Tamponul 1 se însămânțează prin descărcare și dispersie pe cate o placă cu AS, Ach, McC si pe o placă cu SabC. Pentru economie se poate folosi câte 1/2 placă din fiecare MC.

Incubarea plăcilor se face 18- 24 ore la 35⁰C – 37⁰C, uzual aerobă, cu prelungirea incubării până la 48 ore, dacă la 24 ore nu s-au dezvoltat culturi. Placa cu mediul SabC este incubată 24 ore la 37^o și apoi 7 zile la temperatura camerei.

Examenul microscopic

In preparatul lamă-lamelă se urmărește:

- Prezența unei reacții inflamatorii când raportul PMN/CES este peste 1. Inflamația este intensă în trichomoniază, discretă în candidoză și de obicei absentă în vaginoză.

Trichomonas vaginalis este un flagelat piriform, puțin mai mare decât un leucocit, care se depistează în preparatul umed după mișcările sacadate, în diferite direcții, cu 3-4 flageli foarte mobili spre extremitatea voluminoasă, înconjurat de o membrană ondulantă, ușor de recunoscut.

-Prezența celulelor levurice înmugurite și a pseudohifelor miceliene.

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa se evidențiază:

-Prezența reacției inflamatorii, tipul și intensitatea acesteia;

-Prezența flagelatului *T.vaginalis*, a celulelor levurice și a pseudohifelor și se observă morfologia bacteriilor.

Frotiul colorat gram permite o apreciere mai exactă a florei vaginale. În condiții normale aceasta este reprezentată de bacili gram pozitivi lungi, dispuși izolat, în diplo sau lanțuri scurte și constituie flora Doderlein. În vaginoze flora normală e înlocuită cu bacili gram variabili (*G. vaginalis*, *Bacteroides spp*) sau BGN incurbați (*Mobiluncus*).

În vaginitele specifice putem depista:

- *Trichomonas vaginalis* se observă pe preparatul direct, dar și în frotiul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa unde se însoțește de o reacție inflamatorie intensă.

- *Neisseria gonorrhoeae*: se observă prezența unei reacții inflamatorii intense cu PMN integre și lizate și prezența de diplococi gram negativi intra- și extracelular.

- *Candida albicans*: celule levurice și pseudohife gram pozitive.

Vaginitele nespecifice sunt date de o varietate de germeni aerobi și anaerobi, ce fac parte din flora endogenă a vaginului: bacili gram variabili (*G. Vaginalis*, *Bacteroides spp*)

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 13 din 16

sau BGN incurbați (*Mobiluncus*). În vaginoze apar celule vaginale superficiale cu contur mascat de o abundentă flora cocobacilară.

Citirea culturilor

Citirea plăcilor se realizează după 24-48 ore și se urmărește dezvoltarea culturilor de microorganisme implicate în etiologia vaginitelor nespecifice: *Neisseria gonorrhoeae* pe Ach, *Streptococcus* grup B pe AS, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* și *Pseudomonas aeruginosa* pe AS și McC, *Candida* spp pe mediul SabC.

Identificarea

Identificarea izolatelor se face prin : examen microscopic, caractere de cultură, caractere biochimice și identificare antigenică. Pentru identificare se efectuează frotiu din cultură și se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la gonococi și *Pseudomonas aeruginosa*) , testul coagulazei (pentru stafilococi) , medii multitest TSI, mediul manita cu uree, citrat Simmons pentru *Enterobacteriaceae*, test de filamentare pentru levuri.

Interpretarea rezultatelor

. În vaginitele specifice putem depista: *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* și *Candida albicans*.

Vaginitele nespecifice sunt cauzate de o serie de bacterii existente în flora vaginală normală, care pot invada secundar și perturba echilibrul florei bacteriene. În ordinea frecvenței, acestea sunt: *Gardnerella vaginalis*, streptococi beta- hemolitici (mai ales de grup B) , stafilococi, enterobacterii. Semnificație au culturile care prezintă aspect monomorf și ale căror caracteristici coincid cu aspectul morfologic al germenilor din frotiu și cu prezenta leucocitelor.

Constatarea pe frotiu a unui număr mare de bacili gram negativi, ca și a unei reacții citologice, concomitent cu lipsa oricărei culturi pe mediile uzuale aerobe, presupun participarea bacteriilor din grupul *Bacteroides* sau *Fusobacterium*.

Antibiograma

Se realizează pentru izolatele cu semnificație clinică prin metoda difuzimetrică descrisă în procedura „Antibiograma”.

Controlul de calitate

Materialele (mediile de cultură, reactivii și coloranții) utilizate la prelucrarea secrețiilor uretrale și vaginale sunt verificate cu tulpini de referință existente în laborator:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 14 din 16

Aceste controale se efectuează la fiecare lot de mediu achiziționat sau turnat în laborator.

Echipamentele sunt verificate (tehnic si metrologic) după un program prestabilit.

5.4. Prezentarea rezultatelor

Examenul microscopic

Se precizează tipul și intensitatea reacției inflamatorii (cu predominanța de PMN sau Lf) și bacterioscopia: frecvența și caracterele morfotinctoriale ale bacteriilor.

În cazuri urgente, rezultatul se poate comunica telefonic. În scris, rezultatul se comunică în 16-72 ore.

În uretrita gonococică acută rezultatul se comunică sub forma:

„Reacție inflamatorie intensă cu PMN.

Prezenți diplococi gram negativi intra- si extracelulari.”

Culturi

Culturile bacteriene se dezvoltă de obicei în 24-48 ore și rezultatul se comunică imediat ce se identifică tulpina bacteriană, precizându-se specia identificată. Fungii se dezvoltă după 24 ore, culturile fiind urmărite 4 săptămâni. Se comunică rezultatul, precizându-se specia identificată.

5.4.A. Secretia uretrala

Se comunică „Prezența/ absența” următoarelor microorganisme:

Staphylococcus aureus

Neisseria gonorrhoeaea

Enterobacteriaceae

Candida albicans

5.4.B. Secretia vaginala

Se comunică „Prezența/ absența” următoarelor microorganisme:

Streptococcus agalactiae

Staphylococcus aureus

Neisseria gonorrhoeaea

Enterobacteriaceae

Candida albicans

Antibiograma (antifungigrama)

Se realizează conform procedurii PSL-M1-08

5.5. Activități finale

5.5.1. Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de către operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de către șeful de laborator.

5.5.2. Raportarea rezultatelor

Comunicarea rezultatelor se face:

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 15 din 16

- în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant sau pacientului; buletinul de analiză este semnat și parafat de către responsabilul de analiză și managerul tehnic.
- în baza de date a laboratorului și spitalului;
- rezultatele urgențelor se pot transmite telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01. Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită. Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă.

6.2. Responsabilul de analiza

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern, cod F-PGL-5.4-1 F.

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul 01, din registrul de lucru cod RGL-4.4 -0 F și din registrul de comenzi interne/externe, cod RGL-4.4-02I/E și registrul de comenzi respinse cod RPGL-4.4-02.

Examinează preparatele de microscopie optică și culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă și latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimice dezvoltate de bacterii și a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator și formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03 F.

Întocmește și tipărește buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01

Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză FGL-5.8-01 F și îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia tampoanele cu secreții concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură și de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru, cod RGL-4.4-03 F.

Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătită pentru utilizare, în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru însămânțare.

Efectuează însămânțarea produselor biologice pe medii de cultură, pregătește preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

Transmite buletinul de analiză, cod FGL-5.8-03 F registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

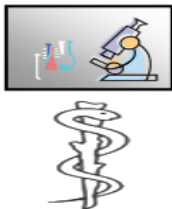
- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR GENITALE COD: PSL – M1 - 06	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 16 din 16

- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 F
- Buletinul de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 F



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA SPECIFICA

**EXAMENUL MICROBIOLOGIC AL
EXSUDATELOR PURULENTE**

COD: PSL – M1 - 07

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Responsabil de analiză
Dr. Olga Filip

**DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.**

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 20

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânanu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 3 din 20

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 20

CUPRINS

- 1.SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
 - 5.1. CONDIȚII PREALABILE
 - 5.2. RESURSE NECESARE
 - 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
 - 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
 - 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 20

Această procedură descrie metoda de izolare și identificare a bacteriilor patogene aerobe dezvoltate la nivel auricular, ocular și tegumentar în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în otite, conjunctivite și infecții ale tegumentului.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț,Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Prospectele truselor de reactivi
-

4.DEFINIȚII SI ABREVIERI

4.1.Definiții

a. Otitele sunt infecții ale urechii medii si externe. Otitele medii se manifestă prin durere locală, hipoacuzie, amețeli, greață; timpanul este congestiv și poate fistuliza cu apariția unei scurgeri purulente în conductul auditiv extern. Pacienții cu otite externe au scurgere otică sero-sanguinolentă sau purulentă din conductul auditiv extern.

b. Conjunctivita este inflamația conjunctivei oculare, iar keratita inflamația corneei. Blefarita înseamnă inflamația marginii superioare a pleoapei.

Hordeolum este o infecție supurativă a glandelor pleoapei cauzată de stafilococi.

c. Puroiul este un exsudat fibrinos, uneori sanguinolent, ce conține: leucocite (predominant PMN in inflamații acute sau mononucleare în inflamații cronice specifice) , resturi celulare și microorganisme determinate.

Semnificație clinică

a. Exsudat auricular

Patologia infecțioasă a urechii este dominată de infecțiile conductului auditiv extern și ale urechii medii.

Urechea medie si internă reprezintă regiuni sterile, dar se pot infecta prin invazia florei locale sau de vecinătate sau în cazul unor boli generale.

Otitele medii, mai frecvente la copii în vârstă de la 3 luni la 3 ani, sunt favorizate de infecții primare cu virusuri respiratorii sau *Mycoplasma pneumoniae* și sunt determinate

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 20

de: *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* și bacterii anaerobe.

Otitele externe sunt cauzate de pseudomonade, *Staphylococcus aureus* și alte bacterii aerobe în condiții favorizante ca: pătrunderea apei în conductul auditiv extern cu macerarea tegumentului la acest nivel (otita inotătorilor) sau diabetul zaharat (otite externe maligne).

b. Exsudat conjunctival

Infecțiile oculare interesează mai frecvent organele anexe (pleoapele și conjunctiva) decât globul ocular și se clasifică în:

- conjunctivite (inflamația conjunctivei) și keratite (inflamația corneei), afecțiuni care frecvent se intrică (kerato-conjunctivite);
- endoftalmite determinate de infecția tunicilor și umorilor globului ocular;
- infecții ale pleoapelor: blefarita (inflamația marginii libere a pleoapei) , dermatita, hordeolum (infecția supurativă a glandelor pleoapei);
- infecții ale aparatului lacrimal: dacriocistite (infecții ale sacului lacrimal) și dacrioadenite (infecții ale glandei lacrimale);
- celulite orbitare.

În infecțiile oculare se pot izola:

- coci gram pozitivi: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*;
- coci gram negativi: *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella lacunata*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter calcoaceticus*;
- bacili gram negativi: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*;
- bacili gram pozitivi: *Bacillus spp*, *Listeria monocytogenes*;
- chlamidii: *Chlamydia trachomatis*
- fungi: *Candida spp*.

Organismele exogene pot fi introduse în ochi prin intermediul mâinilor , a lentilelor de contact , în cazul unor leziuni sau a unor intervenții chirurgicale , precum și prin răspindirea de la țesuturile vecine. De la alte focare de infecție apărute în organism se poate realiza propagarea pe cale hematogenă cu localizare oculară.

Cercetarea bacteriologică a secreției oculare este practică în scopul precizării diagnosticului etiologic în afecțiuni ale ochiului .

c. Puroi

Supurația reprezintă formarea și scurgerea de puroi.

Supurațiile pot afecta orice țesut sau organ cu acumulare de puroi în:

- interstițiile cutanate (pustule, furuncule, hidrosadenita, abcese) ;
- în țesuturi musculo-scheletale (abcese, flegmoane, hidrosadenita, abcese) ;
- în ganglioni limfatici;
- în cavitati preformate (sinusuri paranazale, urechea medie, seroase) , pe suprafețe denudate (plăgi, arsuri).

Colecțiile purulente se pot deschide spontan prin fistule.

Supurațiile cutanate sunt determinate de *Staphylococcus aureus* (foliculita, impetigo, furuncule, carbuncule, hidrosadenita), *Streptococcus pyogenes* (impetigo, celulita, erizipel) .

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sf. Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 7 din 20

Acneea juvenilă este cauzată de asocierea dintre *Staphylococcus aureus* și *Propionobacterium acnes*. Unele bacterii determină leziuni specifice ale pielii: *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium*, *Eryzipelothrix*.

Infecțiile subacute sau cronice ale pielii sunt determinate de microorganisme din grupul *Actinomyces-Nocardia* (abcese granulomatoase, celulite profunde) sau *Mycobacterium* (ulcere, gome).

Infecțiile arsurilor și plăgilor au etiologii diferite în funcție de tipul plăgii. Astfel, plăgile traumatice sunt cauzate de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter*, *Bacteroides*, *Streptococcus pyogenes*. Plăgile de război sunt determinate de bacterii anaerobe, clostridii, plăgile chirurgicale de bacterii din microbiota regiunii anatomice unde a avut loc intervenția chirurgicală, frecvent tulpini de spital (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*), iar plăgile mușcate de animale de *Pasteurella multocida* și *Streptobacillus moniliformis*.

Adenitele supurate au ca etiologie streptococi piogeni, stafilococi, fungi, *Mycobacterium tuberculosis*, iar abcesele viscerale bacterii anaerobe/facultativ anaerobe, *Entamoeba histolytica*.

4.2. Abrevieri

AS: mediu agar cu 5 % sânge;
Ach: agar chocolate;
McC: agar Mac Conkey;
BCC: bulion cord creier;
SabC: mediul Sabouraud cu cloramfenicol;
PMN: polimorfonucleare neutrofile
H: hematii
L: leucocite
CES: celule epiteliale scuamoase
BGN: bacili gram negativi
BGP: bacili gram pozitivi
CGP: coci gram pozitivi

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiții prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecție și va respecta normele de protecția muncii și de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură, coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în frigider.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 20

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider;
- lampa UV
- microscop optic

Resurse

- anse;
- lame microscop;
- ulei de cedru;
- bec de gaz Bunsen;
- baie colorare;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/scala nefelometrica Mc Farland;
- pense;
- pipete automate;
- pipete sterile;
- varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/recipiente pentru solutii dezinfectante;
- lame/lamele;
- eprubete sterile de 10/10;
- stative eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: agar cu 5% sânge de berbec, agar chocolate, agar MacConkey, agar Sabouraud cu cloramfenicol, eprubete sterile cu bulion cord- creier;
- materiale de control, tulpini de referință;
- discuri pentru antibiogramă;
- trusa de colorare Gram, albastru de metilen și May- Grunwald- Giemsa;
- ser fiziologic;
- soluții dezinfectante;
- trusa de identificare grup streptococi;
- trusa de identificare *Staphylococcus aureus*
- medii de identificare a bacililor gram negativi (TSI, manita, indol, fenilalanin dezaminaza, citratdehidrogenaza)

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime turnat in placă, pH- ul mediului, sterilitatea, etc).

5.3. Conținutul procedurii

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 20

Proba este reprezentată de tamponul cu exsudat auricular/conjunctival/puroi prelevat. Principiul biologic care stă la baza examinării secreției auriculare/conjunctivale/cutanate constă în recoltarea și cultivarea produsului patologic, izolarea, identificarea agentului patogen și determinarea sensibilității la antibiotice.

5.3.1. Recoltarea

Recoltarea și transportul la laborator se efectuează conform instrucțiunilor descrise în PO- 06 „Manualul de recoltare a produselor biologice”.

5.3.1.a. Recoltarea exsudatului auricular se face cu tamponul din conductul auditiv extern în otitele externe. În otitele medii prelevatul de elecție este exsudatul aspirat prin timpanocenteză, iar în caz de perforație spontană a timpanului, se prelevă exsudatul de la nivelul fistulei pe un tampon fin steril.

5.3.1.b. Recoltarea exsudatului conjunctival se face de către specialistul oftalmolog. Se poate preleva: exsudat acumulat în sacul conjunctival, utilizând tampoane umectate cu bulion nutritiv, exsudat sero-purulent aspirat cu micropipeta din sacul conjunctival sau raclat cu spatula de platină sterilă de pe conjunctiva tarsală superioară sau inferioară.

5.3.1.c. Prelevarea puroiului se face diferit în funcție de localizarea și de tipul leziunii.

Din leziunile cutanate superficiale închise (vezicule, pustule, fliclene) este indicată recoltarea cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile sau cu acul unei seringi după antiseptizare cu alcool și spălarea cu ser fiziologic steril.

Din leziunile cutanate deschise frecvent se face prelevarea cu tamponul steril, tehnica fiind mai puțin precisă, pentru că recoltează și bacteriile contaminante. Este indicată recoltarea a două tampoane din profunzimea plăgii, prin rotirea fermă a tamponului până apare o ușoară sângerare în țesutul subiacent; un tampon este utilizat pentru efectuarea frotiurilor, iar celălalt pentru însămânțare.

Din ulcerale cutanate cronice se face aspirația lichidului interstițial de sub suprafața denudată prin puncția oblică a țesutului sănătos de la periferia ulcerului cu un ac hipodermic adaptat la o seringă.

Prelevarea puroiului din colecții purulente situate în zonele accesibile puncției (abcese superficiale) se face prin aspirare cu un ac suficient de gros adaptat unei seringi etanșe.

Pentru a recolta puroiul din fistule sunt indicate spălarea și antiseptizarea tegumentului, chiuretarea cât mai profundă a traiectului fisulos cu expedierea în laborator a produsului obținut. Tamponul prelevat de la orificiul fistulei depistează rar adevăratul microb care a determinat supurația.

5.3.2. Transportul

Transportul probelor la laborator se face uzual în maxim 2 ore de la prelevare, exceptând unele situații speciale.

Probele de puroi trebuie transportate imediat la laborator. Dacă transportul durează mai mult de 2 ore, trebuie utilizat un mediu de transport sau probele trebuie refrigerate. Timpul optim pentru transportul produselor patologice depinde de volumul materialului

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 10 din 20

obținut. Volume mici de lichid (<1 ml) trebuie expediate în 15-30 minute pentru a evita evaporarea și uscarea lor, iar volume mai mari și probele expediate în mediu de transport pot fi conservate până la 24 ore.

5.3.3. Procesarea produsului biologic

Asistentul care deservește compartimentul de microbiologie 1 preia tampoanele cu exsudate auriculare/conjunctivale/puroi și formularele de solicitare analize de la registratorul medical, apoi le înregistrează în registrul de lucru, notând date de identificare pacient, analiza și numele operatorului.

În registrul de lucru se notează: numărul curent al probei, data, ID pacient, vârsta, diagnosticul, antibioterapia efectuată, denumirea analizei, metoda folosită, numele operatorului și numele celui care validează analiza.

Etapele examenului microbiologic sunt:

Prelevatul recoltat pe tampon este înșămânțat prin descărcare și dispersie pe plăcile cu medii de cultură indicate pentru fiecare tip de produs, iar apoi tamponul se rulează pe trei lame de microscop curate și se efectuează frotiuri. Se colorează un frotiu cu albastru de metilen, unul gram, iar al treilea este de rezervă.

5.3.3.1. Examenul microscopic

Exsudatul auricular

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen se urmărește tipul și intensitatea reacției inflamatorii, iar pe frotiul colorat gram frecvența și caracterele morfotinctoriale ale microorganismelor.

În otitele externe microscopia este fără valoare din cauza contaminanților.

În otitele medii se pot observa pe frotiu, alături de celulele inflamatorii, coci gram pozitivi în lanțuri sau grămezi, diplococi gram pozitivi lanceolați și capsulați, cocobacili gram negativi, bacili gram negativi sau levuri. Asocierea acestora cu celulele inflamatorii orientează asupra diagnosticului etiologic al otitei.

Exsudatul conjunctival

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen se urmărește tipul și intensitatea reacției inflamatorii: în conjunctivitele bacteriene acute predomină PMN, în timp ce în conjunctivitele bacteriene cronice și în cele virale predomină limfocitele și macrofagele.

Frotiul colorat gram oferă informații despre frecvența și caracterele morfotinctoriale ale microorganismelor implicate. Se pot observa diplococi gram negativi, cocobacili gram negativi, diplococi gram pozitivi lanceolați sau rotunzi, levuri.

Puroiul

Pentru puroiul prelevat în seringă se poate face examenul macroscopic. Se urmărește:

- consistența: cremos în infecții stafilococice, lichid în infecții streptococice și cazeos în infecția tuberculoasă;
- culoarea: variază de obicei de la galben la roșu-brun; este albastru verzui în infecția cu *Pseudomonas aeruginosa* și verzui în infecția pneumococică;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 11 din 20

- mirosul fetid, fecaloid apare în supurații determinate de bacterii anaerobe.

Examenul microscopic se bazează pe examinarea frotiului colorat gram.

Efectuarea frotiului din probele recoltate prin aspirație cu seringă sau pipeta se face prin depunerea unei picături de puroi pe suprafața a două lame curate și întinderea picăturii cu ajutorul ansei până se obține un frotiu subțire și uniform. Dacă puroiul a fost recoltat pe 2 tampoane, unul se rulează pe suprafața unei lame sterilizate prin flambare și răcire, obținându-se un frotiu subțire și uniform. Frotiurile se usucă la temperatura camerei sau pe lampa de platină și se fixează prin căldură. Un frotiu se colorează gram.

Examinarea frotiului gram din plăgi sau abcese este foarte importantă, pentru că oferă o identificare rapidă prezumtivă a etiologiei, poate fi folosit pentru a evalua calitatea probelor primite și ghidează interpretarea rezultatelor culturii. Calitatea probelor din plăgi poate fi evaluată prin compararea numărului de PMN și CES. Prezența în exces a CES sugerează o contaminare cu floră cutanată. Frotiul colorat gram oferă informații referitoare la citologie și bacterioscopie.

Leucocitele apar ca celule inflamatorii rotunde, putând fi diferențiate pe frotiurile bine colorate în PMN, Lf și Mf.

Bacterioscopia se referă la caracterele morfotinctoriale ale bacteriilor și oferă o apreciere semicantitativă a microbilor observați: foarte rari (1/50-100 câmpuri), rari (1/10-20 câmpuri), numeroși (1-10/câmp) și foarte numeroși (zeci-sute/ câmp). În infecțiile mixte cu bacterii anaerobe există bacterii foarte numeroase și polimorfe, ce includ streptococi, bacili gram negativi fini, bacili gram pozitivi subțiri și slab colorați și bacili gram pozitivi mari sugerând *Clostridium* spp.

Puroiul micetoamelor este format dintr-o masă de filamente subțiri, cu diametrul de 0,5-1 micron, gram pozitive și se poate fragmenta în forme cocoide și bacilare difteroidale. Pseudohifele nocardiiilor apar colorate neuniform gram pozitiv. Diferența microscopică a nocardiiilor de actinomicete se face prin acido- rezistență parțială.

Frotiul colorat Ziehl-Neelsen se face la cererea clinicianului sau când bacterioscopia este negativă pe frotiul colorat gram din exsudatele purulente pleurale, articulare, ganglionare sau osoase și se suspectează etiologia tuberculoasă. De asemenea, se indică și la examinarea raclajelor din leziunile cutanate nodulare ale înotătorilor și pescarilor, ce pot fi determinate de *Mycobacterium marinum*.

Colorația Ziehl-Neelsen modificată, cu decolorare scurtă este utilizată pentru a diferenția nocardiiile de actinomicete. Pseudohifele nocardiiilor variază de la acido-rezistență parțială la acido- rezistență completă, iar restul actinomicetelor sunt neacido-rezistente.

5.3.3.2. Cultivarea

Exsudatul auricular

Mediile de cultură folosite pentru însămânțarea exsudatului auricular sunt:

- AS-agar Columbia sau agar nutritiv cu 5% sânge de berbec;
- Ach-agar chocolate;
- McC sau alt mediu selectiv lactozat;
- BCC pentru exsudatul otic recoltat prin timpanocenteza;
- Mediul Sabouraud cu cloramfenicol se poate utiliza la cererea clinicianului, când există suspiciunea etiologiei fungice a otitei.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 12 din 20

Uzual, tamponul cu secreție otică se însămânțează pe o placă cu Ach, o placă cu AS și una cu agar McC (se rulează tamponul pe un cadran al unei plăci cu diametrul de 9 mm și apoi se face dispersia în patru cadrane).

Incubarea se face timp de 24-48 ore în atmosfera cu 5% CO₂ placa cu Ach și în atmosfera aerobă plăcile cu AS, McC sau alte medii folosite.

Citirea plăcilor se realizează după 24-48 ore și se urmărește dezvoltarea culturilor de: *Haemophilus influenzae* pe mediul Ach, *Streptococcus pneumoniae* pe AS sau Ach, *Staphylococcus aureus* pe AS, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp și *Pseudomonas aeruginosa* pe AS și McC, *Candida* spp, *Cryptococcus* sau *Aspergillus* pe mediul SabC.

Exsudatul conjunctival

Mediile de cultură folosite pentru însămânțarea exsudatului conjunctival sunt:

- AS- agar Columbia sau agar nutritiv cu 5% sânge de berbec;
- Ach- agar chocolate;
- McC sau alt mediu selectiv lactozat;
- Mediul Sabouraud cu cloramfenicol se poate utiliza la cererea clinicianului, când există suspiciunea etiologiei fungice a conjunctivitei.

Uzual, tamponul cu secreție conjunctivală se însămânțează pe o placă cu Ach, o placă cu AS și una cu agar McC (se rulează tamponul pe un cadran al unei plăci cu diametrul de 9 mm și apoi se face dispersia în patru cadrane).

Incubarea se face timp de 24-48 ore în atmosfera cu 5% CO₂ placa cu Ach și în atmosfera aerobă plăcile cu AS, McC sau alte medii folosite.

Citirea plăcilor se realizează după 24-48 ore și se urmărește dezvoltarea culturilor de: *Haemophilus influenzae* pe mediul Ach, *Neisseria meningitidis* și *N. gonorrhoeae* pe Ach, *Streptococcus pneumoniae* pe AS sau Ach, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella lacunata* pe AS, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter calcoaceticus* și *Pseudomonas aeruginosa* pe AS și McC, *Candida* spp pe mediul SabC.

Puroiul

Mediile de cultură însămânțate, condițiile și durata de incubare sunt în funcție de conjunctura clinico- epidemiologică, rezultatele microscopiei și caracterele leziunilor supurative examinate.

Pentru izolarea bacteriilor aerobe și facultativ anaerobe cu creștere rapidă din puroi, se însămânțează produsul recoltat pe tampon pe:

- o placă cu AS;
- o placă cu agar McC sau alt mediu cu selectivitate joasă pentru bacili gram negativi.

Probele necontaminate aspirate din cavități închise se însămânțează și pe un tub cu bulion cord- creier și unul cu bulion Schädler.

Incubarea se face 24-48 ore la 37° C în atmosferă aerobă pentru mediile solide și timp de 5 zile la 37° C pentru mediile lichide.

Probele de puroi articular se însămânțează suplimentar și pe o placă cu Ach, incubarea făcându-se la 37° C în atmosfera cu CO₂, timp de 24-48 ore până la 5 zile pentru urmărirea neisseriilor și a culturii în bulion.

Pentru izolarea fungilor se însămânțează produsul pe o placă cu mediul SabC și se incubează la 37° C pentru izolarea formelor tisulare ale fungilor dimorfi și la 30 grade pentru izolarea fungilor filamentoz, culturile urmărindu-se timp de 30 zile.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 13 din 20

5.3.3.3. Identificarea izolatelor se face prin:

- Examen microscopic;
- Caractere de cultură;
- Caractere biochimice;
- Caractere antigenice.

- pentru identificare se efectuează frotiu din cultură și se pot utiliza următoarele teste: catalaza, oxidaza (pozitivă la gonococi și *Pseudomonas aeruginosa*) , testul coagulazei (pentru stafilococi) , test de filamentare pentru levuri. Se poate face identificare automată pe galerie API.

Neisseria meningitidis

- Examen microscopic: diplococi gram negativi, cu diametrul de 0,6-1 mm, fețele adiacente reniforme sau applatizate (în boabe de cafea);
- Caractere de cultură: pe Ach sau AS, după 24-48 ore incubare în atmosferă de CO₂ la 37° C, formează colonii S transparente, de 1-2 mm diametru, rotunde, cu margini regulate, netede, lucioase;
- Caractere biochimice: testul oxidazei pozitiv.

Streptococcus pneumoniae

- Examen microscopic: coci gram pozitivi, lanceolați, frecvent capsulați, dispuși în diplo și în scurte lanțuri;
- Caractere de cultură: pe AS formează colonii gri- opace, alfa- hemolitice, cu diametrul de ~1 mm, care pot autoliza în câteva ore, devenind crateriforme. Tulpinile capsulate formează colonii transparente mucoide. Pe mediile lichide pneumococii cresc, tulburând omogen mediul.
- Testul de sensibilitate la optochin diferențiază prezumtiv streptococii alfa-hemolitici în pneumococi, sensibili (diametrul zonei de inhibiție > 14 mm) și streptococi viridans, rezistenți.

Streptococi beta hemolitici

- Examen microscopic: coci gram pozitivi dispusi in perechi sau in lanțuri scurte.
- Caractere de cultura: pe AS, după 18 ore de incubare aerobă la 37 grade, streptococii de grup A, C sau G formează colonii mici (0,5-1 mm diametru), transparente sau opace, înconjurate de o zonă largă de beta-hemoliză.
- Caractere biochimice:Testul catalazei negativ
- Testul de sensibilitate la bacitracină : diferențierea streptococilor beta-hemolitici se face prezumtiv prin testul la bacitracină în: streptococi de grup A (sensibili in proportie de 99%) si non-grup A (rezistenti in proportie de 97%).
- Reacția de latexaglutinare: Identificarea antigenică a grupului Lancefield se realizează cu trusa de latex aglutinare si permite identificarea streptococilor beta-hemolitici non grup A (grup C sau G).

Staphylococcus aureus

- Examen microscopic: stafilococii apar sub formă de coci rotunzi, dispuși in grămezi neregulate, asemănătoare ciorchinelor de strugure.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 14 din 20

-Caractere de cultură: Obişnuit, coloniile de *S. aureus*, după incubare 18 ore la 37 °C pe mediu solid au aspect S, sunt cremoase, rotunde, cu diametrul de 2-3 mm, margini perfect regulate, suprafața netedă, bombată și lucioasă. Pe AS cu 5% sânge de berbec coloniile au o zonă circulară de hemoliză în jur. Prezența pigmentului carotenoid, portocaliu sau galben citrin, este o caracteristică a tulpinilor de *S. aureus*, dar și a unor stafilococi coagulazo-negativi (*S. saprophyticus*, *S. hominis*). Pigmentogeneza necesită prezența oxigenului și este mai intensă la 20 grade C decât la 37. Nu toate tulpinile de *S. aureus* produc hemolizină sau pigment.

-Testul catalazei:Stafilococii dau testul catalazei pozitiv

-Testul coagulazei: pozitiv

Haemophilus influenzae

- Examen microscopic: cocobacili gram negativi polimorfi;

- Caractere de cultură: pe Ach, în atmosferă cu CO₂, formează colonii gri- lucioase sau semiopace, netede, plane sau convexe, cu margini precise și diametrul de 1-2 mm, rotunde, convexe, transparente sau albastru-verzui.

Enterobacteriaceae

- Examen microscopic: bacili gram negativi

- Caractere de cultură: Fiind nepretențioase nutritiv, cultivă pe toate mediile de cultură utilizate. Pe AS formează colonii „S” de 2-3 mm, bombate, rotunde, umede, cu suprafața netedă și margini regulate sau colonii „R” , rotunde, plate, cu suprafața rugoasă și margini neregulate. Unele tulpini dezvoltă hemoliză. Pe mediile lichide formele „S” tulbură uniform mediul, iar formele”R” tulbură mediul în grade diferite, cu inel și depozit.

- Caractere biochimice: Se folosesc sistemele multitest: TSI (fermentarea lactozei, glucozei și producerea de hidrogen sulfurat), manita (fermentarea manitei, mobilitate și producere de urează), se testează producerea de indol, lizin decarboxilază, citrat dehidrogenază și fenilalanildezaminază. Se poate face și identificarea automată pe galerii API.

Pseudomonas aeruginosa

- Examen microscopic: bacili gram negativi fini

- Caractere de cultură: Cultivă pe toate mediile de cultură, la 5-42° C, optim la 37°C, formand colonii mari, cu luciu metalic, pigmentate în galben-verde sau galben-brun, hemolitice pe AS, ce degajă o aromă asemănătoare florilor de iasomie

- Caractere biochimice: catalaza pozitivă, oxidaza pozitivă, nonfermentativi.

Candida albicans

- Examen microscopic: celule ovale, gram pozitive, unele inmugurite

- Caractere de cultură: pe mediul Sabouraud formează colonii mari, de 2-5 mm diametru, cremoase, albe sau crem, care degajă o aromă de drojdie.

- Testul de filamentare: Se suspensionează câteva colonii de levuri într-o eprubetă ce conține 0,5 ml ser sanguin. Se agită, se lasă la termostat 2-3 ore, efectuează un preparat lamă- lamelă din suspensia obținută și se urmărește la microscop apariția filamentelor. *Candida albicans* dă testul de filamentare pozitiv.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 15 din 20

Cryptococcus neoformans

- Examen microscopic: celule sferice, cu dimensiuni variabile de la 2 la 15 microni, izolate sau înmugurite, de obicei capsulate.
- Caractere de cultură: Pe mediul Sabouraud formează după incubare 24-48 ore la 37 grade colonii albe, cremoase.
- Testul ureazei pozitiv.
- Identificarea definitivă se realizează folosind o galerie de identificare API Candida.

5.3.3.4. Antibiotograma (antifungigrama)

Se realizează conform procedurii PSL-M1-08

5.3.3.5. Controlul de calitate

Materialele (mediile de cultură, reactivii si coloranții) utilizate la prelucrarea exsudatului auricular, conjunctival si a puroiului sunt verificate cu tulpini de referință existente in laborator:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Aceste controale se efectuează la fiecare lot de mediu achiziționat sau turnat în laborator.

Echipamentele sunt verificate (tehnic si metrologic) după un program prestabilit.

Colectarea si distrugerea deseurilor

Se realizează conform instrucțiunilor de lucru, cod IL- Ed.1, Rev.0/ „Colectarea, depozitarea si transportul deșeurilor”.

5.4. Prezentarea rezultatelor

5.4.1. Interpretarea rezultatelor

Pentru identificarea microorganismului patogen se face corelarea caracterelor microscopice, de cultură, biochimice si antigenice.

Exsudatul auricular

În otitele medii, izolarea de *Streptococcus pneumoniae*, *S.pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, în contextul reacției inflamatorii și a bacterioscopiei pozitive la examenul direct, are semnificație clinică.

Otitele externe sunt asemănătoare infecțiilor tegumentului, izolându-se mai frecvent pseudomonade și *Staphylococcus aureus*. Interpretarea culturilor trebuie făcută atent, pentru ca bacteria infectantă poate fi dominată de contaminanți din conductul auditiv extern, ca stafilococii coagulazo negativi și bacilii diferimorfi.

Exsudatul conjunctival

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 16 din 20

În secreția conjunctivală normală apar la examenul microscopic celule descumate integre sau pe cale de liză, rare PMN și Mf și flora microbiană polimorfă: coci, bacili difterimorfi, ocazional levuri. Argumente pentru semnificația clinică a unor microorganisme condiționat patogene sunt: izolarea monomicrobiană sau prezența unui izolat predominant și în cantitate mare în contextul inflamației de pe frotiul direct.

Monomorfismul bacterian asociat reacției inflamatorii sugerează infecția. De exemplu, în conjunctivita gonococică se constată la examenul microscopic diplococi gram negativi asociați reacției cu PMN; același aspect microscopic apare în infecția cu *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter calcoaceticus* și *Neisseria meningitidis*. Pentru a stabili cu precizie etiologia, se urmărește creșterea pe mediile de cultură însămânțate. Dacă s-au dezvoltat culturi pe AS, se urmăresc criteriile microscopice și biochimice de identificare ale bacteriilor *Moraxella lacunata* și *Neisseria meningitidis*. Infecția cu *Acinetobacter calcoaceticus* este indicată de dezvoltarea culturii pe AS și McC.

Prezența cocobacililor gram negativi pe frotiul gram și dezvoltarea pe Ach, în atmosfera cu CO₂, de colonii gri-lucioase sau semiopace, netede, plane sau convexe, cu margini precise și diametrul de 1-2 mm, rotunde, convexe, transparente sau albastru-verzui indică infecția cu *Haemophilus*.

Infecția cu *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus* este sugerată de prezența cocilor gram pozitivi la examenul microscopic și dezvoltarea culturilor caracteristice pe AS.

Observarea bacililor gram negativi la examenul microscopic și pozitivarea culturilor pe toate mediile, orientează spre infecția cu *Enterobacteriaceae* sau *Pseudomonas aeruginosa*, diagnosticul diferențial fiind ușor de realizat prin caracterele de cultură și testul oxidazei.

Numeroase levuri și filamente constatate la examenul microscopic și dezvoltarea culturilor pe mediul SabC indică conjunctivita fungică.

Puroiul

O tulpină microbiană izolată dintr-o supurație superficială are semnificație clinică dacă:

- există corelație între bacterioscopie și cultură;
- există contextul clinic;
- se izolează repetat o bacterie condiționat patogenă în prelevate succesive (e.g. *Staphylococcus epidermidis*).

O tulpină microbiană izolată într-o supurație este considerată contaminant, dacă la examenul microscopic apar multe CES, rare celule inflamatorii, floră microbiană variată, microorganismul este saprofit, condiționat sau accidental patogen, crește pe mediile de cultură asociat de obicei altor microorganisme.

În plăgi și arsuri, streptococii beta hemolitici au semnificație clinică indiferent de cantitatea în care se dezvoltă.

Dacă s-au dezvoltat culturi pe toate mediile uzuale însămânțate, bacteriile izolate sunt nepretențioase nutritiv și aparțin familiei *Enterobacteriaceae* sau genurilor *Acinetobacter* sau *Pseudomonas*, identificarea lor făcându-se prin teste biochimice.

În cazul dezvoltării culturii numai pe AS și pe medii lichide, se fac teste de diferențiere și identificare de: streptococi, pneumococi, enterococi, stafilococi, *Haemophilus*, *Moraxella*.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 17 din 20

Dacă pe mediile de cultură utilizate nu s-au dezvoltat bacterii, dar examenul microscopic arată prezența a numeroase PMN și a multe bacterii: BGN fini și BGP, este posibilă infecția cu o bacterie anaerobă.

5.4.2. Comunicarea rezultatelor

5.4.2.1. Examenul microscopic

Se precizează tipul și intensitatea reacției inflamatorii (cu predominanța de PMN sau Lf) și bacterioscopia: frecvența și caracterele morfotinctoriale ale bacteriilor.

În cazuri urgente, rezultatul se poate comunica telefonic. În scris, rezultatul se comunică în 16-72 ore.

Exsudatul auricular

În buletinul de analiză la examenul microscopic se comunică intensitatea reacției inflamatorii și categoria morfotinctorială asociată reacției inflamatorii. Astfel, dacă reacției inflamatorii cu PMN, se asociază diplococi gram pozitivi capsulați, se specifică:

“Reacție inflamatorie intensă cu PMN. Prezenți diplococi gram pozitivi lanceolați și capsulați”.

Dacă produsul patologic nu este de calitate, predominând CES și flora microbiană variată, se comunică: “Reacție inflamatorie redusă, numeroase celule epiteliale scuamoase. Prezenți coci gram pozitivi și bacili difterimorfi”.

Exsudatul conjunctival

Se notează reacția inflamatorie: absentă sau prezentă, apreciindu-se intensitatea ei și tipul celulelor inflamatorii care predomină. Dacă există celule epiteliale, se semnalează prezența acestora, fiind un marker al contaminării probei. Se comunică rezultatul bacterioscopiei: negativă dacă nu se observă bacterii sau levuri la examenul direct, iar dacă apar bacterii, se semnalează frecvența lor și caracterele morfotinctoriale.

Exemple:

”Reacție inflamatorie intensă cu predominanța PMN. Numeroși cocobacili gram negativi”.

“Reacție inflamatorie redusă. Bacterioscopie negativă”.

Puroiul

În prima etapă se comunică rezultatul examenului frotiului colorat gram, care oferă informații despre calitatea produsului și posibila etiologie a infecției.

Comunicarea unui rezultat sub forma: “Reacție inflamatorie redusă/ absentă, numeroase celule epiteliale. Prezenți numeroși coci gram pozitivi și bacili difterimorfi” semnalează o contaminare cu flora cutanată, solicitând clinicianului o nouă probă, dacă recoltarea este posibilă.

Dacă proba a fost recoltată corect, se menționează tipul și intensitatea reacției inflamatorii, categoria microscopică și aprecierea semicantitativă a microbilor observați.

E.g.: “Reacție inflamatorie intensă cu PMN. Numeroși bacili gram negativi.”

Rezultatul examinării microscopice a frotiului colorat Ziehl-Neelsen se exprimă astfel: “Prezenți/ Absenți bacili acido- alcoolo- rezistenți”.

5.4.2.2. Cultura

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 18 din 20

Culturile bacteriene se dezvoltă de obicei în 24-48 ore și rezultatul se comunică imediat ce se identifică tulpina bacteriană, precizându-se specia identificată. Micobacteriile cresc mai lent, după 2-3 săptămâni de incubare, rezultatul comunicându-se în momentul în care se obține cultura pozitivă („prezent *Mycobacterium* spp”).

Fungii se dezvoltă după 24 ore, culturile fiind urmărite 4 săptămâni. Se comunică rezultatul, precizându-se specia identificată (e.g. ”Prezent *Cryptococcus neoformans*”sau „Prezent *Candida* spp”).

În cazul în care se izolează o specie bacteriană sau un fung, se comunică denumirea microorganismelor identificate și considerate a avea semnificație clinică.

În situația în care culturile sunt negative, se consemnează în buletinul de analiză:”absența microorganismelor (specie, gen) ce pot fi izolate în produsul prelucrat.

Exsudatul auricular

Rezultatul culturii se comunică la 24- 48 ore de la recepția produsului, menționându-se în buletinul de analiză specia sau genul microorganismelor izolate.

Dacă nu s-au dezvoltat culturi după epuizarea perioadei de incubare comunicăm în BA: absența microorganismelor (specie, gen) ce pot fi izolate în produsul prelucrat:

„Absent *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella catarrhalis*, *Candida albicans*”.

Dezvoltarea pe mediile de cultură a mai multor tipuri de bacterii ce fac apartin florei normale a tegumentului și prezența celulelor epiteliale în cantitate mare la examenul microscopic se semnalează în BA: „Floră de contaminare tegumentară”.

Exsudatul conjunctival

Dacă se izolează: un patogen sau un condiționat patogen predominant, în cantitate mare și asociat reacției inflamatorii pe frotiul direct se precizează denumirea speciei bacteriene izolate. În cazul în care nu s-au izolat microorganisme cu semnificație clinică în exsudat, se consemnează în BA absența acestora:

„Absent *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella* spp , *Candida albicans*”.

Izolarea de stafilococi coagulazo negativi, bacili diferimorfi, corelată cu prezența celulelor epiteliale la microscopia directă, se comunică sub forma: „Floră de contaminare tegumentară”.

Puroiul

Rezultatele culturii se comunică la 24- 48 ore de la recepția probei.

Se comunică denumirea microorganismelor identificate și considerate a avea semnificație clinică. Astfel, dacă în cultura se izolează în cantitate mare *Pseudomonas aeruginosa*, rezultatul este: “Prezent *Pseudomonas aeruginosa*”.

În cazul în care culturile au fost negative se comunica în BA: “Absent *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Enterobacteriaceae*, *Candida albicans*”.

5.4.2.3. Antibiotograma (antifungigrama)

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 19 din 20

Antibiograma se realizează prin metoda difuzimetrică sau pe galerie API conform procedurii PSL-M1-08

În infecțiile fungice se face antifungigrama pe galerii API (Fungus 3), rezultatul comunicându-se la 24-48 ore după izolarea și identificarea fungului.

În cazul exsudatului conjunctival, in antibiograma se testează antibioticele incluse în coliruri oftalmice: penicilina, gentamicina, neomicina, tetraciclina, macrolide, cloramfenicol, rifampicina, polimixine, bacitracina.

5.5. Activități finale

5.5.1. Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de catre operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de catre șeful de laborator.

5.5.2. Raportarea rezultatelor

Comunicarea rezultatelor se face:

- în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant sau pacientului; buletinul de analiză este semnat si parafat de catre responsabilul de analiză și managerul tehnic.
- în baza de date a laboratorului și spitalului;
- rezultatele urgențelor se pot transmite telefonic medicului curant.

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic

Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8 011C.

Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă.

6.2. Responsabilul de analiza

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern, cod F-PGL-5.4. 1C sau F-PGL-5.4.-1G.

Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul 01, din registrul de lucru cod R-PGL-4.4-01 C sau R-PGL-4.4-01 G și din registrul de comenzi interne/ externe și registrul de comenzi respinse.

Examinează preparatele de microscopie optică și culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă și latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatic dezvoltate de bacterii și aglutinările pe lamă, respectiv a latex aglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator și formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru.

Întocmește și tipărește buletinul de analiză FGL-5.8-01.

Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză FGL-5.8-01.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ EXAMENUL MICROBIOLGIC AL EXSUDATELOR PURULENTE COD: PSL – M1 - 07	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 20 din 20

6.3. Asistentul de laborator

Preia tampoanele cu exsudate sau secretii concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură și de la asistentul medical de la cabinetul de recoltare.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registru de lucru.

Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătită pentru utilizare, în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru însămânțare.

Efectuează însămânțarea produselor biologice pe medii de cultură, pregătește preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic.

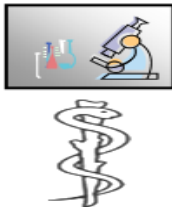
Transmite buletinul de analiză registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltă.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 G
- Buletinul de analiză F-PGL-5.8-01

8. ANEXE

Formularul de solicitare analize medicale de uz intern F-PGL- 5.4-1 G



**Spitalul Clinic de Boli Infecțioase
"Sf.Parascheva,, Iași
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2**

PROCEDURA SPECIFICĂ

ANTIBIOGRAMA

COD: PSL – M1 - 08

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.11.2013

APROBAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânu

VERIFICAT
Sef compartiment
Conf. Dr. Olivia Dorneanu

ELABORAT
Dr. Olga Filip

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sf.Parascheva,, Iași - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 2 din 17

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
R. C	0.		As. Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.		Dr. Rodica Fântânanu					
Sef compartiment	2		Dr. Olivia Dorneanu					

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr. pag. 3 din 17
---	--	--

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprob at

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 4 din 17

CUPRINS

1. SCOPUL
2. DOMENIUL DE APLICARE
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI
5. DESCRIEREA PROCEDURII
- 5.1. CONDIȚII PREALABILE
- 5.2. RESURSE NECESARE
- 5.3. CONȚINUTUL PROCEDURII (EXECUȚIA ANALIZEI, ACTIVITĂȚI)
- 5.4. PREZENTAREA REZULTATELOR
- 5.5. ACTIVITĂȚI FINALE
6. RESPONSABILITĂȚI
7. ÎNREGISTRĂRI
8. ANEXE

1. SCOPUL

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 5 din 17

Procedura descrie metoda de determinare a sensibilității bacteriilor la antibiotice prin tehnica difuzimetrică standardizată Kirby-Bauer.

Laboratorul clinic asistă medicul clinician la inițierea, țintirea și monitorizarea tratamentului antimicrobian. Arsenalul terapeutic antimicrobian este diferit în funcție de categoria agenților infecțioși: bacterii, fungi, protozoare sau virusuri.

Antibiograma difuzimetrică este metoda uzuală pentru laboratoare care testează un număr mic de tulpini bacteriene cu creștere rapidă (creștere peste noapte la 35- 37° C): enterobacteriacee, pseudomonade și alți bacili gram negativi nonfermentativi, stafilococi, streptococi, enterococi, specii de *Neisseria* sau *Haemophilus*. Este necesară pentru ghidarea tratamentului în infecții diverse, fiind foarte utilă clinicianului.

Se poate realiza și în scop epidemiologic, pentru urmărirea emergenței tulpinilor rezistente la medicamentele de elecție și de rezervă și pentru supravegherea spectrului de antibiotip.

Testarea activității in vitro a antibioticelor urmărește orientarea în alegerea terapiei adecvate pentru un pacient .

Relația in vitro, microorganism – antibiotic se definește prin concentrația minimă inhibitoare (CMI) .

CMI este cea mai mică concentrație de antibiotic care inhibă multiplicarea bacteriilor . O tulpină este sensibilă când CMI a antibioticului este de minimum 2-4 ori mai mică decât concentrația serică obținută după administrarea unor doze utilizabile in terapie .

O tulpină este intermediară sau moderat sensibilă cand CMI este apropiat de nivelul seric . Efectul terapeutic se obține cu doze mari (pe cale generală, cand antibioticul este netoxic) sau printr-o concentrare în focarul infecțios (exemplu: urină) .

O tulpină este rezistentă când CMI a antibioticului este mai mare decât nivelul seric.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în cadrul Compartimentului de Microbiologie M1 din Laboratorul de Analize Medicale al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase „Sf. Parascheva” Iași.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- MANUALUL CALITATII
- SR EN ISO 15189:2007 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență;
- SR EN ISO 9000 :2006 - Sisteme de management al calitatii. Principii fundamentale si vocabular.
- SR EN ISO 9001:2008 - Sisteme de management al calitatii. Cerinte.
- D.Buiuc, M.Neguț, Tratat de microbiologie clinica, Editura Medicală,București, 2008
- Metode de laborator de uz curent, Editura Medicală, Bucuresti, 1977
- Standardul CLSI 2013

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 6 din 17

4.DEFINITII SI ABREVIERI

4.1.Definiții

Antibiograma reprezintă metoda de laborator prin care se determină gradul de sensibilitate la diverse antibiotice a unei tulpini bacteriene.

Antibiotic- substanță de origine biologică, semisintetică sau sintetică, ce prezintă activitate selectivă împotriva bacteriilor și este potențial utilizabil în tratamentul infecțiilor.

Sensibilitatea microbiologică se referă la populațiile bacteriene cărora le lipsesc mecanismele de rezistență (populația bazală sau sensibilă).

Rezistența microbiologică definește microorganismele ce posedă orice mecanism de rezistență demonstrată fenotipic sau genotipic. Rezistența poate fi de nivel jos sau înalt (e asociată cu lipsa sinergiei între beta-lactamine și aminoglicozide pentru enterococi).

Intermediar sensibilă este o bacterie ce aparține grupului de tulpini ce se situează între tulpinile clinic sensibile și clinic rezistente.

Rezistența încrucișată este absența parțial sau completă a sensibilității la un grup de antibiotice.

Citire interpretativă a datelor de sensibilitate înseamnă deducția mecanismelor biochimice de rezistență sau a interferenței sensibilității sau rezistenței clinice pe baza fenotipului observat.

Spectru de sensibilitate reprezintă profilul activității unui agent antimicrobian asupra unor variate specii bacteriene sau grupuri de specii (e.g. gram pozitivi sau gram negativi).

Puncte de ruptură sunt valori specifice ale unor parametri cum sunt concentrațiile minime inhibitorii sau zonele de inhibiție.

CMI reprezintă cea mai joasă concentrație (exprimată în mg/L care, în condiții definite, previne creșterea bacteriană într-o perioadă de timp definită).

CMB este cea mai mică concentrație de antibiotic (exprimată în mg/l), care în condiții definite în vitro scade cu 99,9% numărul de microorganisme dintr-un mediu conținând un număr definit de microorganisme într-un interval definit de timp.

Toleranța apare atunci când, în condiții bine definite, o substanță care are de obicei efect bactericid asupra bacteriei testate prezintă un efect bactericid scăzut sau absent, fără scăderea CMI. Toleranța transformă un agent bactericid într-unul bacteriostatic.

Tulpini de referință sunt bacterii catalogate, cu fenotipuri de sensibilitate la antibiotice stabile, definite și sunt utilizate pentru controale de calitate.

Inoculul este reprezentat de numărul de bacterii dintr-o suspensie, calculat prin raportare la volumul final și se exprimă în UFC/ ml.

Zona de inhibiție este aria lipsită de creșterea bacteriană sub forma de strat de creștere, care rezultă în urma efectului inhibitor al antibioticului care a difuzat în mediu din sursa aplicată. Diametrul zonei de inhibiție este exprimat în mm.

Profilul de sensibilitate la antibiotice al unei specii bacteriene este suma antibioticelor față de care sunt sensibile majoritatea sau toate tulpinile unui lot reprezentativ testat.

4.2. Abrevieri

MH- mediu Muller Hinton;
HS- mediu Muller Hinton sânge;
SF- ser fiziologic;

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 7 din 17

ATCC- American Type Culture Collection;
 CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute;
 NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards;
 NCTC - National Collection of Type Culture;
 S- sensibil;
 I- intermediar;
 R- rezistent;
 CMI- concentratia minima inhibitoare;
 mg/l- miligram/ litru ;
 BA- buletin de analiză;
 BLSE- beta- lactamaze cu spectru extins

5. DESCRIEREA PROCEDURII

5.1. Condiții prealabile

Operatorul care efectuează analiza va purta echipament de protecție si va respecta normele de protecția muncii si de lucru specifice laboratorului.

Pregătirea materialelor de laborator

Mediile de cultură,coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2- 3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

5.2. Resurse necesare

Echipamente

- hota cu flux laminar
- termostat
- frigider;
- lampa UV

1.9. REACTIVI SI ALTE SUBSTANȚE

- medii de cultură: plăci cu agar Mueller Hinton sau Hinton sânge turnat în strat uniform de 4 mm grosime (25 ml mediu per placă cu diametrul de 9 mm);
- materiale de control, tulpini de referință;
- trusa cu discuri antimicrobiene comercializate de diferite firme (păstrate la 4-8° C, cu exceptia beta- lactaminelor ce se păstrează la -15° C);
- ser fiziologic;
- soluții dezinfectante;
- rigla sau subler
- tulpini de referință.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 8 din 17

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime turnat in placă, ph- ul mediului, sterilitatea, etc). Pentru controlul sterilitatii, o placa din lot este incubata 24 ore la 37 grade C.

Resurse

- anse;
- bec de gaz Bunsen;
- cutii Petri;
- tampoane exsudat;
- densimat/ scala nefelometrică Mc Farland (etalon 0,5 Mc Farland);
- pensa oftalmologică sau repartizor automat de discuri;
- pipete sterile;
- varfuri albastre si galbene pentru pipete automate;
- cristalizor/ recipiente pentru soluții dezinfectante;
- eprubete sterile de 10/ 10;
- stativ eprubete;
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile.

Reactivi

- medii de cultură: plăci cu agar Mueller Hinton sau Hinton sânge turnat în strat uniform de 4 mm grosime (25 ml mediu per placă cu diametrul de 9 mm);
- materiale de control, tulpini de referință;
- trusa cu discuri antimicrobiene comercializate de diferite firme (păstrate la 4-8 grade, cu exceptia beta- lactaminelor ce se păstrează la -15 grade);
- ser fiziologic;
- soluții dezinfectante;
- rigla sau subler
- tulpini de referință.

Mediile de cultură sunt preparate în laborator sau comercializate, fiecare lot de mediu care intră în laborator fiind însoțit de certificat de calitate, ce atestă conformitatea cu cerințele specificate (grosime turnat in placă, ph- ul mediului, sterilitatea, etc). Pentru controlul sterilității, o placă din lot este incubată 24 ore la 37° C.

5. Conținutul procedurii

A. Antibiograma difuzimetrică

Proba este reprezentată de colonii din cultura pură a organismului de testat în creștere activă.

Prin depunerea discurilor cu antibiotice pe suprafața unui mediu agarizat preînsămânțat cu bacteria testată, se produce concomitent difuzarea antibioticului și creșterea bacteriei. După perioada critică de incubație se conturează două zone

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 9 din 17

distincte: una de inhibiție a creșterii bacteriene, în care antibioticul are concentrații mai mari decât CMI și o zonă de creștere bacteriană, unde concentrația antibioticului este prea mică.

Diametrul zonei de inhibiție variază invers proporțional cu CMI.

Bacteria testată este clasificată ca sensibilă, intermediară sau rezistentă prin raportarea la tabele interpretative.

5.1. Condiții prealabile

Mediile de cultură, coloranții se prepară de către asistentul de laborator, se toarnă în plăci Petri și recipiente și apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.

Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticlute, flacoane) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.

Asistentul de laborator aduce în compartimentul de lucru plăcile cu medii de cultură și sticlăria sterilizată estimată a se utiliza 2-3 zile și se păstrează în frigider plăcile cu medii de cultură și în cutii cu capac eprubetele, sticlutele și lamele.

5.2. Elemente de standardizare

Fiecare din componentele utilizate la efectuarea antibiogramelor pot influența diametrul zonei de inhibiție și criteriile de interpretare (e.g. un inocul prea bogat va determina un diametru de inhibiție mai redus și invers). Standardizarea trebuie să atenueze diferențele legate de mediul de cultură, inocul, incubație, stabilitatea substanțelor antimicrobiene. Mediul de cultură utilizat pentru efectuarea antibiogramelor bacteriilor nepretențioase nutritiv este geloza Mueller- Hinton și trebuie să respecte câteva caracteristici:

- pH 7,2-7,4;
- concentrația gelozei 1,5%-1,7%;
- grosimea stratului de geloză de 4 mm (25 ml mediu pentru o placă de 9 mm)

Conservare: plăcile turnate se pot păstra la frigider în pungi de plastic timp de 7 zile.

Uscare: plăcile scoase din frigider se lasă pe masă timp de o oră și apoi 10-20 minute la termostat; nu se utilizează plăcile cu lichid de condens pe suprafața mediului sau pe capac.

Pentru efectuarea antibiogramelor bacteriilor pretențioase nutritiv se folosesc suplimente nutritive:

- pentru testarea sensibilității streptococilor beta-hemolitici, pneumococilor, neisseriilor, mediul MH se suplimentează cu 5% sânge de berbec;
- pentru *Neisseria gonorrhoeae* supliment HYL (sânge lacat + autolizat de levură și ficat 10%);
- pentru testarea speciilor de *Haemophilus* se adaugă supliment Fields (digestie pepsică de sânge 5%).

Procedura

- Se scot din frigider plăcile cu medii Mueller Hinton/ Hinton sânge și dipenserele sau ambalajele cu microcomprimare de antibiotice și se mențin, închise etanș 1-2 ore pentru echilibrare termică.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 10 din 17

– Plăcile cu agar MH sau HS se mențin 20-30 minute cu capacul întredeschis în termostat la 37 grade pentru a se usca suprafața lor.

– Se pregătește inoculul:

Se prelevă ~5 colonii separate dezvoltate pe mediu solid în culturi de 16- 20 ore, se suspendă în ser fiziologic sau bulion și se ajustează la turbiditatea de 0.5 Mc Farland cu ajutorul densimatului sau prin compararea cu etalonul de sulfat de bariu 0.5 Mc Farland. După pregătirea inoculului, acesta trebuie însămânțat în maxim 15 minute.

În situații de urgență, poate fi folosit ca inocul, produsul patologic necontaminat (LCR) sau cu contaminare nesemnificativă (probe curate de urină prinsă în zbor din jetul mijlociu) și se face antibiograma difuzimetrică pe cultura primară. Eșantioanele din hemoculturi sau culturi în bulion ale LCR pot fi folosite pentru prepararea unui inocul.

Însămânțarea plăcilor: se iversează tamponul de vată steril în suspensia etalonată, se scurge excesul de lichid prin rotirea tamponului pe peretele tubului, apoi se descarcă tamponul în striuri paralele pe toată suprafața mediului succesiv în trei direcții prin întoarcerea plăcii cu câte 60 grade, efectuând în final un striu marginal circular.

– Placa însămânțată se lasă 3-5 minute pentru adsorbția inoculului.

– Se depun discurile cu antibiotice cu ajutorul dispenserului sau cu o pensă, respectând distanța de 15 mm de marginea plăcii și 30 mm între centrele a două discuri vecine. După depunerea discurilor, acestea se presează ferm cu ansa pe suprafața mediului.

– Se incubează plăcile 16-18 ore la 37 grade. În termostat nu se incubează mai mult de trei plăci una peste alta.

– Se respectă restricțiile de timp: pentru etalonarea inoculului 15 minute, pentru aplicarea discurilor 5-15 minute și pentru plasarea plăcilor în termostat 15 minute.

– Atmosfera de incubare este în aerobioză pentru majoritatea microorganismelor, excepție făcând *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria spp*, *Haemophilus spp*, care sunt incubate în atmosfera cu 5-10% CO₂.

5.3. Selectarea substantelor antimicrobiene

Substanțele antimicrobiene pentru antibiograma sunt livrate sub formă de microcomprimate cu diametrul de 6 mm, având notat simbolul antibioticului. Conservarea lor se face prin menținerea la adăpost de lumină, căldură și umiditate (la frigider). Înainte de utilizare se lasă o oră la temperatura camerei pentru echilibrare termică.

Se fac testări cu un număr restrâns de antibiotice selectate pentru grupe largi de microorganisme constituite pe baza particularităților de sensibilitate ale unor categorii microscopice (e.g. stafilococi, streptococi, bacili gram negativi) sau a particularităților focarului de infecție (e.g. izolatele urinare).

Pentru grupele de antibiotice cu activitate similară se alege un singur reprezentant (e.g. tetraciclina pentru toate tetracilinele). Standardul CLSI recomandă seturi de substanțe test pentru testarea sensibilității bacteriilor aerobe și facultativ anaerobe, pretențioase sau nepretențioase nutritiv.

a. Testarea sensibilității stafilococilor

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 11 din 17

Pentru *Staphylococcus aureus*: penicilina, cefoxitin, eritromicina lângă clindamicină, gentamicina, kanamicina, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina, cotrimoxazol, rifampicina, cloramfenicol, doxiciclina, tetraciclina, teicoplanina, linezolid, ceftarolin.

Staphylococcus spp coagulazo negativ: oxacilina, cotrimoxazol, gentamicina, ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina, clindamicina; pentru cel izolat din UC: oxacilina, ciprofloxacina, gentamicina, cotrimoxazol, nitrofurantoin.

Determinarea tulpinilor de MRSA (*Staphylococcus aureus* metilino-rezistent) se face prin utilizarea microcomprimatului de 30 micrograme de Cefoxitin, pe mediu MH adăugat cu 4% Na Cl și incubare la 35° C timp de 18-20 ore. A doua zi se citește diametrul zonei de inhibiție: dacă este > 22 mm, tulpina este sensibilă la cefoxitin (oxacilina), iar dacă este < 21 mm, tulpina de *S.aureus* testată este rezistentă la cefoxitin (este MRSA).

Determinarea sensibilității la Vancomicină se face prin metoda E- test de determinare a CMI.

Testarea sensibilității stafilococilor față de aminoglicozide este suficientă față de kanamicină, tobramicină și gentamicină. Rezistența la kanamicină (fenotip K), la kanamicină și tobramicină (fenotip KT) sunt predictive pentru rezistența la amikacină. Rezistența la kanamicină, tobramicină și gentamicină (fenotip KTG) este predictivă pentru rezistența la amikacină și netilmicină.

Rezistența inductibilă MLSB (macrolide, lincosamine, sinergistine B).

Testul difuzimetric recomandat pentru rezistența inductibilă MLSB constă în aplicarea pe suprafața mediului MH a unui disc de eritromicină în imediata apropiere a unui disc de clindamicină. Aplatizarea zonei de inhibiție în jurul discului de clindamicină sau lincosamide (aspect de litera „D”) indică un fenotip MLSB inductibil.

Interpretare

Stafilococii sensibili la penicilină și oxacilină sunt sensibili la toate beta-lactaminele.

Stafilococii sensibili la oxacilină (cefoxitin) și rezistenți la penicilina sunt rezistenți la penicilinele penicilinazo- labile: ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina și sunt sensibili la celelate beta-lactamine.

Tulpinile de stafilococi rezistente la metilina, oxacilină sau /și cefoxitin sunt considerate rezistente la toate beta-lactaminele.

Se comunică în BA și prezența fenotipului MLSB inductibil sub forma “rezistență inductibilă la clindamicina”, avertizând astfel clinicianul că utilizarea de clindamicină sau lincosamină nu este recomandată în infecțiile cauzate de aceste tulpini.

b. Testarea sensibilității streptococilor

Se efectuează antibiograma difuzimetrică prin prepararea unui inocul cu densitatea 0,5 Mc Farland și însămânțarea lui pe o placă cu agar MH suplimentat cu 5% sânge de berbec. Microcomprimatelor utilizate pentru testarea sensibilității streptococilor sunt:

- pentru streptococii beta hemolitici: eritromicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, levofloxacina, ofloxacina, clindamicina, cloramfenicol (la peniciline și- au păstrat sensibilitatea și nu se testează uzual);

- pentru streptococii viridans: cefotaxim, ceftriaxona, eritromicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, levofloxacina, ofloxacina, cloramfenicol, clindamicina, linezolid; testarea sensibilității la penicilină (ampicilină) se face prin determinarea CMI utilizând metoda E- test.

Citirea diametrelor de inhibiție se efectuează pe suprafața mediului.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 12 din 17

c. Testarea sensibilității pneumococilor

Se procedează ca pentru streptococi, utilizând mediul HS. Pentru testarea sensibilității la penicilină se folosește discul de 1 microgram de oxacilină. Trusa pentru antibiograma pneumococilor conține discuri de: oxacilină, vancomicină, eritromicină, claritromicină, tetraciclină, levofloxacină, cotrimoxazol, cloramfenicol, rifampicină, clindamicină, linezolid, ceftarolin. Pentru izolatele din lichidul cefalorahidian se utilizează doar: oxacilină, cloramfenicol, rifampicină.

Interpretare: dacă zona de inhibiție la oxacilină depășește 20 mm, tulpina este sensibilă la penicilină, ampicilină, ampicilină-sulbactam, cefaclor, cefpodoxim, cefuroxim, imipenem, meropenem. Dacă diametrul zonei de inhibiție la oxacilină este mai mic de 20 mm, tulpina de pneumococ poate fi sensibilă, intermediară sau rezistentă la penicilină și este indicată determinarea CMI pentru a aprecia sensibilitatea la penicilină și cefotaximă (utilizând metoda E-test).

d. Testarea sensibilității enterococilor

Antibiograma difuzimetrică pentru enterococi se realizează pe mediul MH, cu incubare 24 ore la 37 grade, utilizând următoarele discuri de antibiotice:

- pentru izolate urinare: penicilină sau ampicilină, nitrofurantoin, ciprofloxacină, gentamicină de 120 micrograme, vancomicină, teicoplanină, linezolid;
- pentru alte izolate: penicilină sau ampicilină, ciprofloxacin, gentamicină de 120 micrograme, eritromicină, doxiciclină, rifampicină, cloramfenicol, vancomicină, teicoplanină, linezolid.

Tratamentul infecțiilor sistemice grave determinate de enterococi (endocardite subacute) se face cu o asociere dintre un agent inhibitor al peretelui bacterian (penicilină, ampicilină sau vancomicină) și un aminoglicozid. Efectul sinergic nu apare dacă tulpina este rezistentă la penicilină/ ampicilină/ vancomicină sau dacă are rezistența înaltă față de aminoglicozide.

Testarea nivelului înalt de rezistență a enterococilor față de aminoglicozide se face utilizând la antibiograma difuzimetrică discuri cu 120 micrograme de gentamicină sau 300 micrograme de streptomycină. După incubarea 24 ore la 35- 37° C, se apreciază diametrul zonei de inhibiție:

- > 10 mm : sensibilă;
- 7-9 mm: intermediar sensibilă;
- <6 mm: rezistentă.

Interpretare

Tulpinile rezistente la gentamicină sunt rezistente și la celelalte aminoglicozide, cu excepția streptomisinei.

Enterococcus faecium e natural rezistent la kanamicină, amikacină, tobramicină, netilmicină.

Tulpinile de enterococ sensibile la penicilină au sensibilitate și la ampicilină, amoxicilină, ampicilină- sulbactam, amoxicilină- acid clavulanic, piperacilină, piperacilină- tazobactam.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 13 din 17

Pentru tulpinile de enterococi sensibile la ampicilină se poate raporta și sensibilitatea la ampicilină- sulbactam, amoxicilină- acid clavulanic, piperacilină, piperacilină-tazobactam, imipenem.

Microcomprimetele de cefalosporine, clindamicină și cotrimoxazol pot părea active in vitro față de enterococi, dar sunt ineficiente clinic și nu trebuie raportate ca sensibile.

e. Testarea sensibilității meningococilor

Antibiograma difuzimetrică pentru meningococi se efectuează pe mediul HS, cu incubare 20-24 ore la 37° C, în atmosfera cu bioxid de carbon. Se face testarea cu discuri de cefotaximă, meropenem, cloramfenicol, rifampicină; se pot adăuga microcomprimete de azitromicină, ciprofloxacina, cotrimoxazol, în cazul în care se urmărește profilaxia contactilor din focarul de meningită.

Testarea sensibilității meningococilor la penicilină și cefotaximă se face folosind metoda E- test pentru determinarea CMI. Tulpinile cu CMI < 0,06 micrograme/ ml, sunt sensibile la penicilină, iar cele cu CMI > 0,5 sunt rezistente.

f. Testarea sensibilității hemofililor

Antibiograma difuzimetrică pentru hemofili se realizează pe mediul HTM (Haemophilus Test Medium), cu incubare 20-24 ore la 37° C în atmosfera cu CO₂. Microcomprimetele utilizate pentru testare sunt:

- pentru izolate din lichidul cefalorahidian: ampicilina, o cefalosporină de generația a 3-a (ceftriaxonă, cefotaxim sau ceftazidim), cloramfenicol și meropenem;
- pentru alte izolate: ampicilină, amoxicilină- acid clavulanic, o cefalosporină de generația a 3-a (ceftriaxonă, cefotaxim sau ceftazidim), meropenem, cloramfenicol, azitromicină, cotrimoxazol, ciprofloxacina, rifampicină, tetraciclină.

Interpretare

Dacă tulpina e sensibilă la tetraciclină, atunci are sensibilitate și la doxiciclină și minociclină.

Rezistența *Haemophilus influenzae* la ampicilină e asociată cu rezistența la cloramfenicol, tetraciclină, cotrimoxazol.

g. Testarea sensibilității enterobacteriaceelor

Antibiograma difuzimetrică pentru enterobacteriacee se realizează pe mediul MH, cu incubare 18-24 ore la 35-37° C. Metoda utilizată ne permite să detectăm și tulpinile de enterobacteriacee producătoare de beta- lactamaze cu spectru extins (BLSE). BLSE reprezintă beta- lactamaze ce conferă bacteriilor producătoare rezistență la peniciline, cefalosporine inclusiv cele de generația a 4-a, monobactame, dar nu au acțiune asupra carbapenemelor și cefamicinelor (cefoxitin). Pentru depistarea BLSE utilizăm testul de sinergie între două microcomprimete.

Pe placa cu mediul MH pregătită pentru realizarea antibiografei (însămânțată cu tulpina de testat), se plasează discul de amoxicilină- acid clavulanic (20/10 micrograme) între un disc cu cefotaxim (30 micrograme) și unul cu ceftazidim (30 micrograme) sau cefpodoxim (10 micrograme), la o distanță de 20-30 mm între centre. Dacă tulpina de testat este producătoare de BLSE se observă o deformare a zonelor de inhibiție a

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 14 din 17

cefalosporinelor, cu extinderea zonei de inhibiție către discul de amoxicilină-acid clavulanic, sub forma unui dop de șampanie.

Pentru efectuarea antibiografei enterobacteriaceelor, folosim în prima etapă discuri de antibiotice uzuale, ce permit și depistarea BLSE, urmând ca în a doua etapă să testăm tulpina la antibiotice de rezervă (dacă este producătoare de BLSE sau este multirezistentă la antibioticele uzuale). Microcomprimatele utilizate sunt:

- în prima etapă: ampicilină, amoxicilină- acid clavulanic între cefotaxim și ceftazidim sau cefpodoxim, cefoxitin, gentamicină, ciprofloxacina, cotrimoxazol (și nitrofurantoin pentru izolatele urinare);
- în etapa a 2-a: cefepim, imipenem, ertapenem, meropenem, piperacilină-tazobactam, levofloxacină, tobramicină, amikacină.

Interpretare și raportare

Tulpinile de *Escherichia coli* și *Klebsiella* spp producătoare de BLSE se raportează rezistente la peniciline, cefalosporine și aztreonam, indiferent de rezultatul antibiografei.

Pentru izolatele fecale de *Salmonella* și *Shigella* se raportează numai sensibilitatea la ampicilină, o fluorochinolonă și la cotrimoxazol, iar pentru izolatele extraintestinale de *Salmonella*, se adaugă sensibilitatea la o cefalosporină de generația a 3-a și la cloramfenicol.

h. Testarea sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiograma difuzimetrică pentru *Pseudomonas aeruginosa* se realizează pe mediul MH, cu incubare 16-18 ore la 35-37° C, utilizând următoarele discuri de antibiotice:

piperacilină, piperacilină- tazobactam, ceftazidim, aztreonam, imipenem, meropenem, colimicină, gentamicină, tobramicină, amikacină, ciprofloxacina.

Tulpinile de *P. aeruginosa* pot dobândi rezistența după 3-4 zile de tratament cu un antibiotic, de aceea trebuie retestate din punct de vedere al sensibilității la antibiotice.

i. Testarea sensibilității tulpinilor de *Acinetobacter* spp

Antibiograma difuzimetrică pentru *Acinetobacter* se realizează pe mediul MH, cu incubare 20-24 ore la 35-37° C, folosind discuri de:

ampicilină-sulbactam, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicină, tobramicină, amikacină, ciprofloxacina, cotrimoxazol, doxiciclină.

5.4. Controlul de calitate

Exactitatea sau acuratețea testului este definită prin concordanța dintre rezultatul observat (CMI sau diametrul zonei de inhibiție) și valoarea adevărată sau acceptată.

Este obligatorie testarea tulpinilor de referință, în condiții identice cu tulpinile de examinat, la fiecare lot nou de microcomprimate și la fiecare lot nou de mediu achiziționat sau turnat în laborator.

Tulpini de referință utilizate:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 15 din 17

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Echipamentele sunt verificate (tehnice și metrologice) după un program prestabilit.

5.5. Procesarea rezultatelor

Citirea și interpretarea rezultatelor

Se admit pentru citirea antibiografei numai plăcile cu o cultură corespunzătoare din punct de vedere al purității și densității.

Se măsoară cu rigla gradată diametrul zonelor de inhibiție completă, în lumina reflectată, pe spatele plăcii în cazul mediilor transparente sau pe suprafața agarului în cazul mediilor cu sânge. La măsurarea zonei de inhibiție se face abstracție de hemoliză pe mediile cu sânge, de coloniile fine, periferice, de vâul invaziv format de *Proteus* și de creșterea pulverulentă în zonele sulfamide și trimetoprimului. Coloniile mari din zona de inhibiție pot fi contaminanți sau forme rezistente ale bacteriei testate, de aceea trebuie identificate.

În caz de urgență, se poate face citirea antibiografei după 5-6 ore de incubare, cu condiția verificării după 16-18 ore.

Diametrul zonelor de inhibiție determinat de fiecare antimicrobian testat, se compară cu valorile înscrise în standardul CLSI și se încadrează în categoria sensibil, intermediar sau rezistent.

Surse de erori

Apar în următoarele situații:

- utilizarea unui alt mediu decât MH sau HS pentru efectuarea antibiografei;
- folosirea de microcomprimate expirate sau degradate;
- însămânțarea unui inocul nestandardizat;
- testarea pe culturi mixte;
- citirea imprecisă a diametrelor zonelor de inhibiție;
- lipsa controlului de calitate.

Comunicarea rezultatelor

Pentru fiecare tulpină bacteriană testată se comunică rezultatele antibiografei difuzimetrice, enumerând antibioticele la care tulpina bacteriană este sensibilă, intermediar sensibilă sau rezistentă.

De exemplu, antibiograma unei tulpini de *S. aureus* fenotip MLSB izolată dintr-o hemocultură va fi comunicată în modul următor:

SENSIBIL: ciprofloxacină, levofloxacină, rifampicină, gentamicină, tobramicină, cloramfenicol, teicoplanină, linezolid

INTERMIAR: cotrimoxazol

REZISTENT: penicilină, oxacilină, eritromicină, clindamicină (rezistență inductibilă), doxiciclină, tetraciclină, kanamicină.

5.6. Activități finale

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 16 din 17

Validarea

Validarea tehnică a analizelor este realizată de către operator.

Validarea bioanalitică a rezultatelor este realizată de către șeful de laborator.

Raportarea

Comunicarea rezultatelor se face:

-în scris prin buletinul de analiză care este trimis medicului curant ; buletinul de analiză este semnat și parafat de către responsabilul de analiză și managerul tehnic.

-în baza de date a laboratorului și spitalului;

-rezultatele urgențelor se transmit telefonic medicului curant.

5.B. E-Testul

E- Testul imbină testarea cantitativă cu testarea difuzimetrică.

Se utilizează pentru testare o bandă de 5 mm / 50 mm din plastic inert, pe suprafața căreia este fixat un gradient exponențial de antibiotic, cu 15 diluții între 0,016 și 256 ml sau 0,002 și 32 mg/L ; pe cealaltă suprafață este marcată scala de lectură în $\mu\text{g/ml}$ corespunzătoare CMI.

Se procedează în prima etapă ca la antibiograma difuzimetrică : o placă cu mediu MH/HS este însemănată cu tulpina de testat, după prepararea unui inocul cu densitatea de 0,5 Mc Farland. Pe suprafața plăcii se aplică radiar banda E –test (impregnată cu antibioticul de testat) având scala de lectură în sus. Se incubează 18-24 ore la 35-37° C în atmosfera aerobă sau cu CO₂ și a doua zi se citește CMI, fiind indicat de intersecția dintre zona eliptică de inhibiție a culturii și scala de gradient a benzii. Valoarea CMI obținută se compară cu valorile CMI din standardul CLSI, permițând încadrarea tulpinii testate ca sensibilă, intermediară sau rezistentă la antibioticul testat.

Utilizăm această metodă pentru :

- testarea sensibilității meningococilor și pneumococilor la penicilină și cefotaxim,
- determinarea sensibilității stafilococului auriu la vancomicină,
- testarea sensibilității enterobacteriaceelor la cefotaxim și combinația cefotaxim-clavulanat (pentru depistarea tulpinilor producătoare de BLSE).

6. RESPONSABILITATI

6.1. Managerul tehnic:

Verifică și aprobă prin semnătură și parafează buletinul de analiză.

Oferă consultanță beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită.

Execută analizele pentru care este responsabil și validează rezultatul acestora prin semnătură și parafă.

6.2. Responsabilul de analiză

Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize de uz intern. Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deservește compartimentul M1, din registrul de lucru , din registrul de comenzi interne și registrul de comenzi respinse.

Citește și interpretează rezultatele testelor de determinare a sensibilității microorganismelor la substanțe antimicrobiene.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	PROCEDURA SPECIFICĂ ANTIBIOGRAMA COD: PSL – M1 - 08	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 17 din 17

Întocmește și tipărește buletinul de analiză.

Verifică, semnează și parafează buletinul de analiză și îl prezintă managerului tehnic spre aprobare.

6.3. Asistentul de laborator

Preia plăcile cu tulpinile bacteriene izolate pentru realizarea antibiogramei.

Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID- ul probelor în registru de lucru.

Transportă mediile de cultură și sticlăria pregătită pentru utilizare, în compartimentul de lucru și pregătește mediile de cultură pentru antibiograme.

Efectuează antibiograma difuzimetrică sau E-testul, utilizând microcomprimatele sau benzile cu antibiotice indicate de medic.

Transmite buletinul de analiză registratorului medical.

7. INREGISTRARI

- Registrul de comenzi interne/externe RGL-4.4-01 I/E
- Registrul de comenzi respinse RGL-4.4-02
- Registrul de analiză RGL-4.4.-01 A-F
- Buletinul de analiză FGL-5.8-01

8. ANEXE

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	INSTRUCTIUNE DE LUCRU STERILIZAREA MEDIILOR IN AUTOCLAV COD: IL – M1 - 01	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 1 din 1

Recipientele se umplu cu soluție doar 80% din capacitate.

Parametrii sterilizării sunt: temperatura de 121°C, presiunea de 1 atm, timp de 30 min.

Pune apa distilata in cazanul aparatului pana la nivelul gratarului inferior robinetul de drenaj si cel de evacuare fiind corect inchise.

Introdu flacoanele cu mediile de cultura si martorii sterilizării in cos, lasand spatii libere pentru circulatia nestanjenita a aburului.

Inchide capacul autoclavului etans si se conecteaza la sursa principala de alimentare.

Apasa intrerupatorul principal (se aprinde imediat). Ecranul microprocesorului va afisa ultimul program executat. Se selecteaza programul potrivit (121°C, 1 atm, 30 minute). Se apasa butonul „START/STOP” pentru a incepe procesul de sterilizare.

Pe ecran apare mesajul "PURGE HEATING" (evacuare a aerului, incalzire). Cand pe ecran apare mesajul "HEATING", temperatura creste treptat de la 20 la 121°C.

Cand temperatura a ajuns la 121°C, timp de 30 min. pe ecran apare mesajul STERILIZING, ceea ce reprezinta efectuarea sterilizării la parametrii indicati.

La terminarea procesului de sterilizare pe ecran apare mesajul END OF PROCESS, insotit de un semnal sonor. Se apasa tasta STOP .

Se deschide robinetul de evacuare a aburilor si se asteapta pana cand acul manometrului revine la 0.

Se deschide capacul autoclavului si se scot materialele supuse sterilizării si martorii eficientei sterilizării.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	INSTRUCTIUNE DE LUCRU STERILIZAREA USCATA LA ETUVA COD: IL-M1-02	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 1 din 1

Racordati etuva la rețeaua electrica.

Apasati intrerupatorul general; se va aprinde.

Plasati in etuva materialele de sterilizat ambalate, lasand spatii intre ele. Incepeti cu prima tava, **niciodata** direct pe fundul raftului inferior al etuvei.

Plasati martorii sterilizarii.

Mutati butonul termostatlui de siguranta la capatul gradatiei sau minim 35°C peste temperatura de regim.

Cand temperatura este stabilizata la temperatura fixata, rotiti usor butonul termostatlui de siguranta in sens opus acelor de ceasornic, pana cand se aprinde indicatorul cu lumina rosie.

Rotiti usor butonul butonul in sensul acelor de ceasornic si tineti apasat butonul de resetare pana cand indicatorul cu lumina rosie se stinge. Indicatorul luminos trebuie sa fie stins.

Dupa atingerea parametrilor de sterilizare (180°C, 60 minute), intrerupeti alimentarea.

Scoateti materialele din etuva numai dupa ce se racesc.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	INSTRUCTIUNE DE LUCRU COD: IL-M1-03 MOD DE LUCRU HOTA CU FLUX LAMINAR VERTICAL	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 1 din 1

Se stabilesc etapele de lucru si se strang materialele necesare in apropierea dispozitivului.

Se porneste ventilatorul si se ajusteaza viteza de lucru.

Se dezinfecteaza spatiul de lucru si ustensilele ce vor fi introduse in incinta.

Se aseaza materialele in incinta astfel incat sa nu impiedice fluxul de aer. Se lasa o distanta de 10-15 cm fata de margini.

Se lasa aparatul sa functioneze 10-20 minute inainte de inceperea lucrului.

Dupa folosire se dezinfecteaza suprafata de lucru.

Se regleaza viteza ventilatorului la minim si se mentine ventilatorul in functiune pana la sfarsitul zilei de lucru.

Circulatia persoanelor prin incapere se va reduce la minim.

Intretinere:

Filtrul primar se spala (apa calda, detergent) dupa aproximativ 160 ore de functionare sau de 1-2 ori pe luna. Se inlocuieste dupa 5-7 spalari.

Extrage filtrul din aparat prin ridicarea gratarului aflat pe panoul frontal.

Spitalul Clinic de Boli Infecțioase”Sf.Parascheva,, Iași Laboratorul de analize medicale	INSTRUCTIUNE DE LUCRU MOD DE LUCRU pH-metru COD: IL-M1-04	Editia 1 Revizia 0 Exemplar nr.
		pag. 1 din 1

Apasati scurt orice tasta pentru a porni aparatul. Daca nu este conectat nici un electrod, apare mesaj de eroare.

Imerseaza electrodul aproximativ 2 mm in solutia de masurat.

Cat timp citirea nu s-a stabilizat, valoarea masurata clipeste.

Poti schimba masurarea intre pH si mV.

Asteapta stabilizarea citirii. O valoare stabila a fost atinsa cand valoarea citita nu mai clipeste.